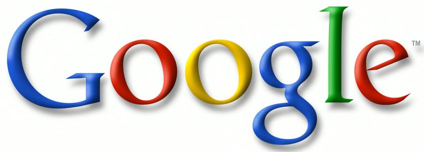
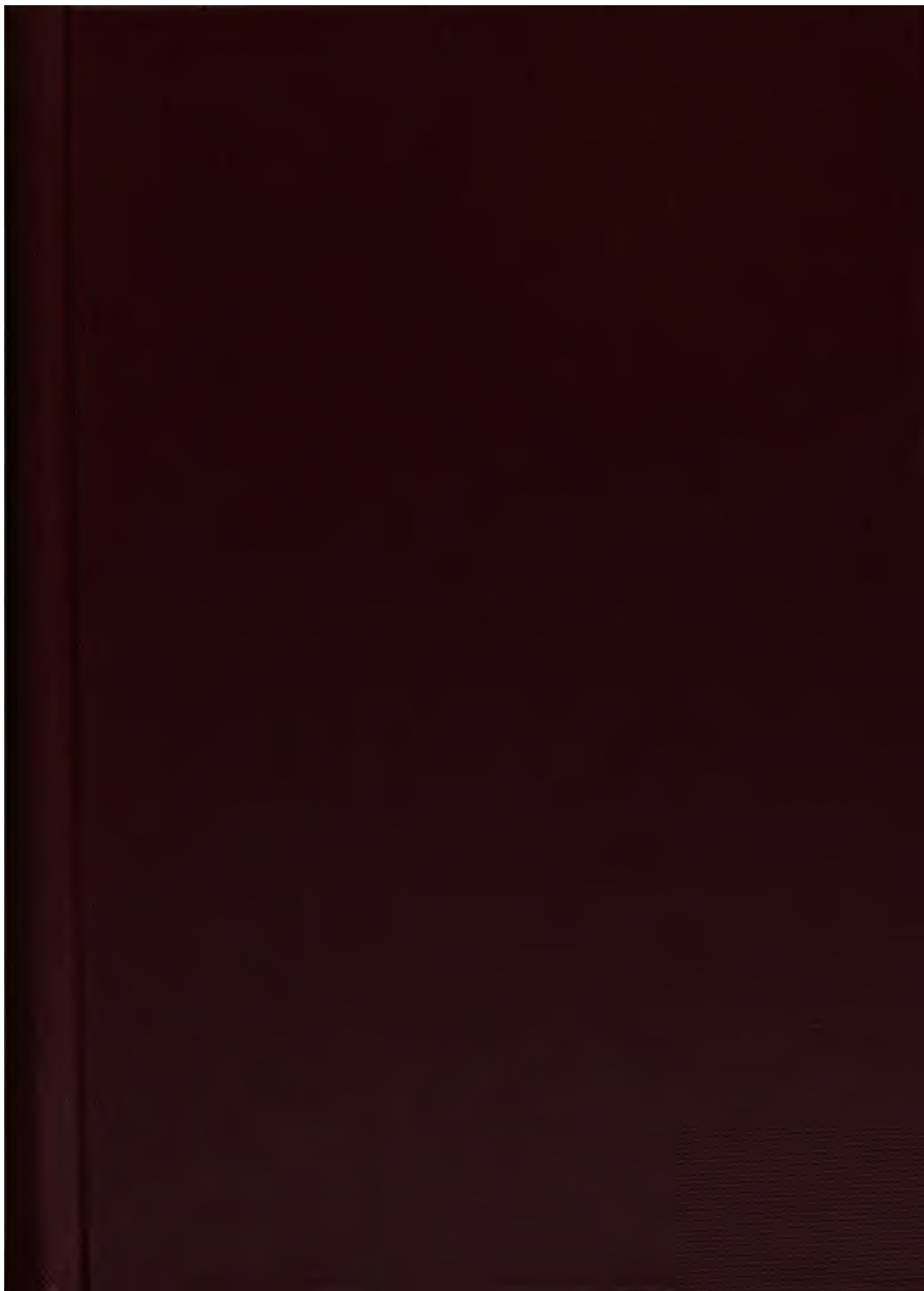
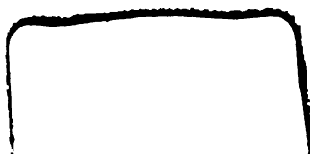

Google







[redacted]

[redacted]

ANNALI
D'IGIENE SPERIMENTALE

PUBBLICATI DAI PROFESSORI

G. BORDONI - UFFREDUZZI (Milano) — P. CANALIS (Genova) — O. CASAGRANDI (Cagliari) — A. CELLI (Roma) — C. FERMI (Sassari) — V. DE GIAXA (Napoli) — E. DI MATTEI (Catania) — A. DI VESTEA (Pisa) — A. MAGGIORA (Modena) — L. MANFREDI (Palermo) — G. ROSTER (Firenze) — G. SANARELLI (Bologna) — F. SANFELICE (Messina) — A. SERAFINI (Padova) — G. SORMANI (Pavia) — G. ZIINO (Messina)

E DIRETTI DAL

PROF. ANGELO CELLI

(Continuazione degli *Annali dell'Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Roma*)

VOLUME XVI (NUOVA SERIE) — ANNO 1906
(CON 4 TAVOLE CROMO-LITOGRAFICHE)



UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO — TORINO — ROMA — NAPOLI

1906

INDICE DEL PRESENTE FASCICOLO

Roma, 1906 — Tip. Nazionale di G. Bertero e C.

LABORATORIO DI BATTERIOLOGIA DELLA SANITÀ PUBBLICA

COMMISSIONE MILITARE PER LO STUDIO DELLE INFEZIONI EQUINE

Sulla eziologia del così detto tifo o febbre petecchiale del cavallo

Contributo allo studio della piroplasmosi equina

dei veterinari militari prof. L. **BARUCHELLO** e dott. **N. MORI**
(con le tavole I e II).

Alcune forme morbose del cavallo, non abbastanza studiate ancora, vengono indicate col nome generico di *affezioni tifoidi*.

È certo che pochi argomenti di patologia veterinaria sono tanto confusi come questo, essendochè le varie distinzioni e classificazioni proposte, son basate su concetti sintomatici, piuttosto che sui dati eziologici, per la mancanza dell'esatta conoscenza degli agenti specifici, che determinano ciascuna forma.

Gli scrittori, e sono molti, che si sono occupati di ciò, si possono dividere in due categorie: in quelli che ammettono essere le affezioni tifoidi malattie fra loro affatto diverse nell'intima natura, erroneamente accomunate, per una certa grossolana somiglianza di sintomi; ed in altri, che le credono manifestazioni di una sola contagiosa infermità, da ascriversi al gruppo delle *setticemie emorragiche*, determinata da uno stesso agente patogeno, tipo colera dei polli (*bacterio ovoide* di Hueppe, *pasteurella* di Lignières).

L'idea di Servolés (1), il quale ammetteva che il tifo del cavallo fosse identico al tifo dell'uomo, venne combattuta con prove irrefragabili da Nocard (2), il quale inoculò, senza alcun risultato, cavalli per via sottocutanea, endoperitoneale e nelle vene, con grandi quantità di culture di bacillo di Eberth, ed inutilmente cercò questo germe negli organi dei cavalli affetti da tifo; per cui conchiuse la lunga serie dei suoi esperimenti, affermando che non vi è nulla di comune fra il tifo del cavallo e quello dell'uomo, tranne lo stato di depressione e di stupidità, che corrisponde clinicamente allo *stato tifoso*.

Rivolta (3) divise le affezioni tifoidi del cavallo:

1° *in tifo ematico o tifoemia;*

2° *in tifo cerebrale o spinale;*

3° *in tifo polmonare;*

4° *in tifo addominale od epatico;*

5° *in tifo emorragico* (che si manifesta colle petecchie, coll'ematuria, con tumefazioni od ingorgamenti).

Diecheroff (4), Siedamgrotski (5) ed altri, considerano le affezioni tifoidi come tre malattie diverse:

1° *Scalma* o bronchite epizootica, o grippe, catarro infettivo delle vie respiratorie.

2° *Brustseuche* o pleuro-polmonite infettiva, influenza pettorale, *Lungenseuche.*

3° *Pferdestaupe,* o febbre tifoide, influenza vera, (*Rothlaufseuche* di Schütz).

Friedberger e Fröhner (6), Schneidemül ed altri distinguono poi dalla febbre tifoide o *Pferdestaupe* il tifo o febbre petecchiale (*Das Petecchialfieber, Pferdetyphus, Blutfleckenkrankeit, Morbus maculosus*) e credono che sia malattia infettiva, ma di causa ignota. Anche Röl (8) tratta del tifo del cavallo (*Der sogenannte Pferdetyphus*).

Perroncito (7) considera il tifo del cavallo come « morbo proteiforme, non contagioso, che si inizia con una alterazione nella crasi del sangue ».

Galtier e Violet (9) riuniscono la *Brustseuche* e la *Pferdestaupe* di Diecheroff in una unica entità morbosa, alla quale dànno il nome di *pneumo-enterite da foraggio,* ritenendola prodotta dall'uso abituale di foraggi guasti, sui quali i germi specifici vivrebbero saprofiti, pronti a svilupparsi alla prima occasione.

Cadéac (10), Cadiot, ecc., accettarono questa pneumo-enterite *da foraggio* di Galtier e Violet, ma non quale entità che comprenda varie forme tifoidi note, sebbene come una nuova malattia tifoide, da collocarsi nel gruppo colle altre.

Micellone (11) propose, con molto criterio clinico, di designare come entità morbose diverse l'una dall'altra, e non come forme di una stessa categoria, le seguenti malattie:

1° *Influenza (grippe).*

2° *Pleuro-polmonite contagiosa.*

3° *Febbre tifica o tifoidea.*

4° *Tifo petecchiale o esantematico.*

Il Moretti (12) distingue la febbre tifoide del cavallo in:

1° *Forma essenziale o tossiemica.*

2° *Forma addominale.*

3° *Forma respiratoria.*

4° *Forma nervosa.*

Il Levi (13) separa nettamente l'influenza dalla febbre tifoide, e di questa riconosce varie forme a seconda delle localizzazioni. Esso fa poi un capitolo a parte della febbre petecchiale e un altro dell'*anasarca idiopatico di Bouley,* che molti autori considerano come malattia identica al tifo o febbre petecchiale (Friedberger e Fröhner (6), Bassi e Venuta (14), ecc.).

Brusasco e Boschetti (15) dicono che, non essendo ancor possibile una

classificazione eziologica delle affezioni tifoidi del cavallo, sia da preferirsi, per i bisogni della pratica e per le esigenze didattiche, una classificazione clinica e propongono la seguente:

1° *Influenza delle prime vie respiratorie e digerenti.*
2° *Tifoide toracica o pettorale.*
3° *Tifoide addominale.*
4° *Tifoide cerebrale.*
5° *Tifo o febbre petecchiale.*

E anche questi autori separano poi dal tifo o febbre petecchiale, e descrivono a parte, l'*anasarca idiopatico* di Bouley.

I lavori di Lignières (16), concludono nel senso della unicità delle affezioni tifoidi ed hanno molto influito a far prodominare attualmente il concetto che si tratti, in ultima analisi, di una sola malattia e la varietà delle forme cliniche sia dovuta alle diverse localizzazioni del germe specifico (*pasteurella*) e alla diversa natura, e al vario modo di comportarsi delle infezioni miste, che si verificano nel decorso di esse (17).

Il Nocard (18) ha accettato i risultati degli studi di Lignières e divide le *pasteurellosi*:

1° *in affezione tifoide o influenza;*
2° *in pneumonite infettiva.*

Nocard e Leclainche (19), nel loro trattato, comprendono sotto la denominazione di *febbre tifoide* o *influenza* anche quella forma morbosa che altri autori distinguono e denominano *tifo;* però giustamente osservano: « In Europa la *malaria del cavallo,* non fu identificata che in Italia, ma è probabile che numerosi focolai rimangano sconosciuti».

***

Da questo breve riassunto bibliografico, risulta come sia cosa anche difficile intendersi sul significato delle diverse denominazioni, che dagli autori, nei diversi paesi, vengono date alle forme cliniche comprese nell'ingarbugliato capitolo delle affezioni tifoidi del cavallo, che il Nocard ha giudicato essere *un caos.* Emerge pertanto la necessità di ulteriori studi, alla stregua dei moderni criteri eziologici.

In una nota preventiva (20), abbiamo riferito sui risultati di alcune ricerche da noi eseguite su di una malattia, che in ogni estate si osserva, con vasta estensione, in Roma e nella provincia, producendo danni notevoli, fra i cavalli dei privati e della guarnigione, e fra quelli dei reggimenti che convengono da varie parti d'Italia, per le esercitazioni di tiro, ai poligoni d'artiglieria di Nettuno e di Bracciano. I veterinari curanti indicano una tale forma morbosa coi nomi di: *tifo*, *febbre tifoide*, *tifo petecchiale*, *febbre petecchiale*, *influenza*, *pasteurellosi* (21).

Da diverso tempo, abbiamo intrapreso uno studio metodico di questa malattia, allo scopo di determinare l'agente o gli agenti di specifici.

Le culture, fatte con sangue di animali infermi, in tutti i terreni, sono rimaste costantemente sterili. Le culture eseguite con materiali presi dagli organi ammalati, hanno dato luogo allo sviluppo di germi di probabile provenienza intestinale (*b. coli* e *streptococchi ed altri di natura non bene definita*), incapaci, ciascuno di essi, inoculato nel cavallo, di riprodurre la malattia.

Le iniezioni del sangue di animali infermi nel peritoneo delle cavie, o nelle vene dei conigli, rimasero senza risultato.

Maggior fortuna ebbero le nostre ricerche microscopiche sul sangue. Nella nota preventiva citata, abbiamo riferito di avere messo in evidenza nel sangue di 4 cavalli, pei quali era stata formulata la diagnosi di *tifo* o di *febbre tifoide petecchiale*, viventi in scuderie diverse a Roma, ed uno di essi ammalatosi a Bracciano, la presenza di parassiti protozoari endoglobulari; per cui concludemmo esprimendo il nostro convincimento che l'infezione fosse da ascriversi tra le malariche.

Non abbiamo allora potuto stabilire in modo assoluto, il nesso esistente tra i parassiti osservati e il tifo o febbre petecchiale, poichè, a rigore, non si poteva escludere la possibilità che i 4 cavalli, oggetto delle nostre ricerche, ricettassero precedentemente e per pura coincidenza, parassiti malarici; ma, in seguito, abbiamo esteso le nostre osservazioni, e, mentre numerosi esami del sangue di cavalli sani, tenuti nelle identiche condizioni di vita di quelli divenuti ammalati, ci hanno dato risultati costantemente negativi, nel sangue dei cavalli ammalati abbiamo sempre riscontrato il parassita, che venne studiato in diversi periodi della malattia, sorprendendolo nelle varie fasi caratteristiche di sviluppo.

Per cui crediamo di poter ora affermare che dal gruppo delle affezioni tifoidi del cavallo è necessario, anche in Europa, scindere e ben definire un capitolo delle *piroplasmosi*, perchè di tale natura è, senza alcun dubbio, l'infezione studiata.

Anche nei tempi passati si è parlato di malaria del cavallo, per analogia alla malaria umana, sulla base del decorso intermittente della febbre o per i vantaggi che si ricavano dall'uso dei sali di chinino. Di lavori importanti dal lato clinico, citeremo quello di Dupuy (22) che fece alcune osservazioni sui cavalli in Senegambia; quello di Popow (23) che descrisse una forma morbosa, che suppose malarica, dominante in una regione coperta di laghi e di stagni, con clima umido e malsano nel Caucaso; quello di Pierre (24) che studiò nei cavalli del Sudan francese, una malattia dominante, coi sintomi di paludismo.

Spesso fu attribuita alla malaria l'eziologia di forme cliniche di incerta natura, ma, mancando le constatazioni dal lato parassitario, è impossibile

riconoscere se si sia sempre trattato di affezioni malariche, o di altre malattie.

In seguito, progrediti i mezzi di ricerca e stabilita, nell'uomo e negli animali, la natura della così detta *malaria*, questa, per riguardo al cavallo, fu generalmente considerata come malattia esotica, particolarmente delle regioni tropicali, quantunque la prima osservazione di parassitismo endoglobulare del cavallo sia avvenuta in Italia.

Nel 1899 (25) il dott. Guglielmi, veterinario nella provincia di Lecce, descrisse un caso isolato di malaria in un cavallo che presentava: mucose apparenti pallide; bocca secca, polso piccolo e frequente, temperatura a 40°, moti respiratori accelerati; inappetenza, inquietudine, ansietà e segni di dolori addominali. Gli venne l'idea che potesse trattarsi di malaria, avendo osservato un andamento febbrile intermittente, e infatti, all'esame del sangue, osservò nei globuli rossi corpicciuoli di varia forma (circolare, ovoide, oblunga, curvata, a bastoncino, della grandezza di 1-2 μ); non riscontrò altre forme.

Nel 1901 Laveran (26) denominò il protozoo endoglobulare del cavallo, studiato da Bordet e Danysz nell'Africa del sud, nel Transvaal specialmente, *piroplasma equi* e così lo descrive:

« Si presenta sotto l'aspetto di piccoli elementi sferici o allungati, ovalari, più raramente piriformi e quasi sempre endoglobulari. Misura, in media, da 0,5 a 2,5 μ di diametro, e più spesso da 1 a 1,5 μ.

« Nei preparati, ben colorati col suo metodo, si distingue un cariosoma, che si colora in rosso violetto, mentre il protoplasma si colora in bleu. Negli elementi più grossi si vede spesso una zona chiara, che circonda il cariosoma.

« Le forme di moltiplicazione sono numerose nella milza. La divisione si può fare in due o in quattro. La bipartizione è assai comune; il cariosoma si allunga, poi si divide in due parti; i due cariosomi di nuova formazione prima riuniti, si allontanano e il protoplasma a sua volta si divide. I due giovani elementi, così formati, possono dividersi e dar luogo a quattro piccoli parassiti. Altre volte la divisione si fa subito per quattro.

« Che la divisione si faccia per due o direttamente per quattro, essa mette capo alla formazione di quattro giovani elementi ed è cosa comune trovare emazie, che contengano quattro parassiti, e questa disposizione per quattro costituisce uno dei caratteri morfologici più apparenti del *Piroplasma equi* ».

Il Laveran osservò che la piroplasmosi equina non è in rapporto colla malaria dell'uomo; e che l'*horse-sickness* (*peste equina*) è indipendente dalla piroplasmosi; le due malattie possono coesistere, e coesistono assai spesso nel Transvaal.

Nell'Africa del sud la piroplasmosi equina che è denominata *febbre biliosa*, fu studiata particolarmente da Theiler (27) (1902-1903), il quale osservò che il parassita endoglobulare è sempre presente nel sangue al principio della malattia, ma può mancare nel corso di essa, pur essendo evidenti i sintomi; e che l'animale muore, malgrado la sparizione completa dei piroplasmi. La somministrazione della chinina e del cloruro d'ammonio è seguita da una rapida sparizione del parassita, ma d'altra parte lo stesso fatto venne osservato nei cavalli non curati; in tutti i casi, i fenomeni

clinici persistono dopo la scomparsa del parassita. L'A. ammette che il *P. equi* predisponga ad una infezione secondaria, dovuta ad un bacillo specifico, la quale si può anche stabilire dopo guarigione completa della piroplasmosi.

Il bacillo descritto assomiglia alle *pasteurelle*, ma ne differisce per qualche proprietà; è nettamente patogeno per il cavallo, ma produce accidenti che non assomigliano alla malattia originale. Lo ha rinvenuto in 18 casi di complicazioni post-malariche, mentre era assente in 41 casi (30,5 p. 100).

In un lavoro più recente Theiler (28) riferisce che, prima della guerra del Transvaal, la *piroplasmosi equina* era ivi rara, e si osservava sopratutto negli animali importati.

Durante la guerra e dopo la guerra, essa è divenuta assai comune, per l'enorme aumento di animali d'importazione, tutti sensibili. I cavalli nati ed allevati nell'Africa del sud, o almeno quelli che sono allevati su territori dove esistono zecche, possiedono una immunità acquisita e perpetua, come quella dei bovini rispetto all'emoglobinuria.

Dale (30) nel 1903 ha osservato nel Transvaal un'affezione enzootica degli asini, riconosciuta per *piroplasmosi*, in seguito all'esame del sangue fatto da Theiler. Gli animali di ogni razza venivano colpiti, anche quelli del paese; però questi dimostravano una maggior resistenza, perchè non soccombevano mai. Non ha potuto determinare i rapporti fra la malaria del cavallo e quella dell'asino; una dozzina di cavalli, messi al pascolo con mille asini contaminati, sono rimasti immuni. Theiler (43) però crede che le piroplasmosi del cavallo, dell'asino e del mulo, quantunque differiscano alquanto clinicamente (perchè nell'asino manca il giallore e si ha sopratutto anemia acuta o progressiva, a seconda che la malattia è a decorso rapido o cronico) siano prodotte dall'identico parassita.

La *piroplasmosi equina* è stata studiata nel Madagascar da Thiroux (31) nel 1903. Egli nel sangue di cavalli affetti da una malattia che ha per principali sintomi lo stato cachettico, paraplegia e osteoporosi con fratture spontanee, ha trovato dei piccoli corpi rotondi, alcuni liberi, altri intraglobulari, che non lasciavano alcun dubbio sulla loro natura parassitaria, e vennero riconosciuti dal Laveran per *piroplasmi*. Il Thiroux ha egualmente osservato nel Madagascar la piroplasmosi acuta descritta dal Theiler, ma crede che, oltre alle forme acute, esistano dei casi cronici, che terminano colla cachessia e paraplegia; l'osteoporosi non sarebbe probabilmente prodotta dalla stessa causa.

Koch nel 1904 osservò la suddetta infezione nella Rodesia (32). Nei tentativi di trasmissione per inoculazione da cavallo a cavallo ebbe risultati positivi solo in casi molto speciali. Bowill (33) l'osservò nella Colonia del Capo, ed ha per la prima volta segnalato, oltre alle forme del parassita rotonde, a pera, a bastoncino, a rosetta, di quattro individui provenienti dalla divisione di un solo, qualche forma a pera libera o endoglobulare munita di un flagello. Non è riuscito a trasmettere la malattia colle inoculazioni di sangue; crede che con probabilità un attacco della malattia conferisca l'immunità.

Edington (1901-1905) (34) si è pure occupato molto della piroplasmosi equina. E' riuscito a trasmettere l'infezione anche agli animali indigeni: si dimostrarono meno sensibili quelli provenienti dalla costa. Un cavallo

sano, dopo aver passato la notte nel « *Veldt* », è divenuto capace di trasmettere col suo sangue la malattia a due cavalli sani. Avendo osservato che l'inoculazione di sangue di un animale infetto generalmente conferisce l'immunità, raccomanda questa pratica quale misura preventiva.

Eassie (35) per osservazioni fatte su alcuni muli importati dall'Africa del Sud, e che vi hanno contratto la febbre, dopo brevissimo tempo, distingue un attacco primario ed uno ricorrente, che rassomiglia all'anemia progressiva della Surra. Egli ritiene, senza prova microscopica, ma basandosi su dati clinici, che la *piroplasmosi equina* esista pure in Birmania, sulle frontiere della Cina e in Australia.

Ziemann (1904) (36) ebbe occasione di fare osservazioni di piroplasmosi equina nel Venezuela e nel Camerun; Lingard e Jennings (1904) (37), nelle Indie. Questi ultimi autori, nel laboratorio di Bareilly (contrafforte dell'Imalaia), hanno avuto occasione di osservare infezioni da piroplasmi, oltre che nei bovini e negli equini, anche negli elefanti, nei cammelli, nelle capre e nelle pecore, nei cani inglesi ed indigeni, nei gatti, nelle scimmie, nei cervi, in razze inglesi di volatili e nelle lucertole.

Piot-Bey (1905) (38), dice che in Egitto esiste una malattia della quale la forma clinica, il decorso, le lesioni hanno la più grande affinità colla piroplasmosi descritta da Theiler nell'Africa del Sud, e da Dupuy e Pierre nel Sudan Francese. La malattia si presenta sotto due forme, una acuta, assai grave, che comincia con prostrazione di forze, febbre intensa, tinta itterica delle mucose, petecchie sulle congiunture, emoglobinuria, morte in 4-5 giorni; ed una leggera, più frequente, dura 2-3 settimane e, dopo varie manifestazioni, finisce generalmente colla guarigione. I cavalli indigeni sono dotati di una certa resistenza; i cavalli europei, al contrario, sono quasi tutti colpiti. Un primo attacco conferisce l'immunità. Manca il reperto microscopico.

In Europa, dopo la prima osservazione fatta fin dal 1899, dal Guglielmi, che abbiamo citata, le ricerche sulla esistenza o meno di focolai di malaria del cavallo hanno progredito ben poco.

Nel 1903 lo stesso Guglielmi (39), riferisce un secondo caso, di un cavallo, che si presentava molto emaciato e lento nei movimenti; le congiuntive erano pallide, con lacrimazione dell'occhio destro; la mucosa orale pallida con tinta subitterica; il polso piccolo e debole; atti respiratori 10, temperatura 38°.5, appetito diminuito; mitto sanguigno di color rosso vivo, pene un po' pendente, stato apatico; coricandosi, per rialzarsi aveva bisogno di aiuto. Dice di aver rinvenuto gli stessi parassiti descritti nella prima nota, inoltre di avere riscontrato qualche forma a pera e più raramente a croce.

Merita pure di essere segnalata una comunicazione fatta il 7 settembre 1901, dal Russi (40) al Congresso della Federazione veterinaria Italiana, in Milano. All'esame microscopico del sangue di cavalli affetti da una forma morbosa spesso dominante nel Tavoliere delle Puglie, ebbe a rilevare particolari microorganismi endoglobulari, di rado liberi nel plasma e che sommariamente così descrive: « qualche volta unici o triplici, quasi sempre doppi, aventi forma tondeggiante, elissoide, per lo più acuminati ad un estremo, di rado semilunari. In numerose osservazioni fatte, appena tre volte ho potuto scorgere il parassita a forma di pera, doppio nel medesimo globulo e riunito per l'estremità acuminata ».

In Germania lo Ziemann (41) nel 1902, esaminando il sangue di un cavallo affetto da una debole forma di *Kreuzrhehe*, accompagnata da ematinuria, vide nelle emazie dei piccoli parassiti mobilissimi, i quali non si potevano differenziare dalle giovani forme dell'emoglobinuria dei bovini. L'inoculazione del sangue di questo cavallo ad uno sano non avendo riprodotto la malattia, l'A. rimase in dubbio se si trattasse di un'infezione protozoaria (*).

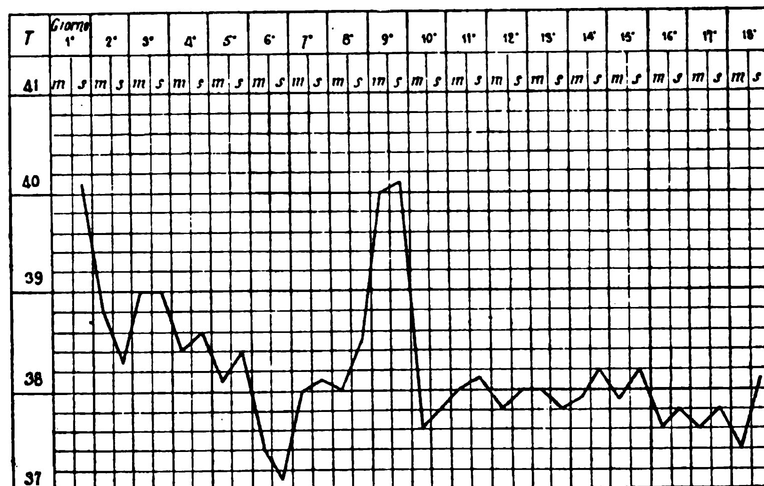
* * *

Passiamo ora ad una dettagliata descrizione del processo morboso, quale ci risulta dalle nostre particolari osservazioni, ripetutamete fatte nelle epizoozie di Roma e circondario.

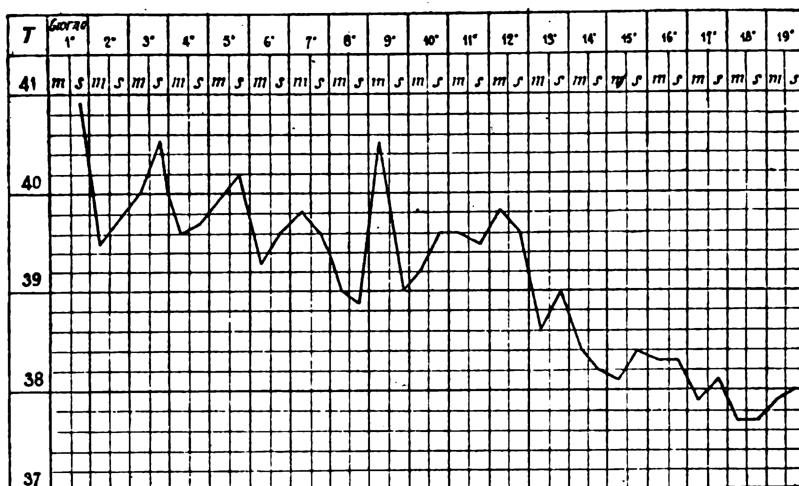
SINTOMI. — La malattia si presenta col seguente quadro clinico:

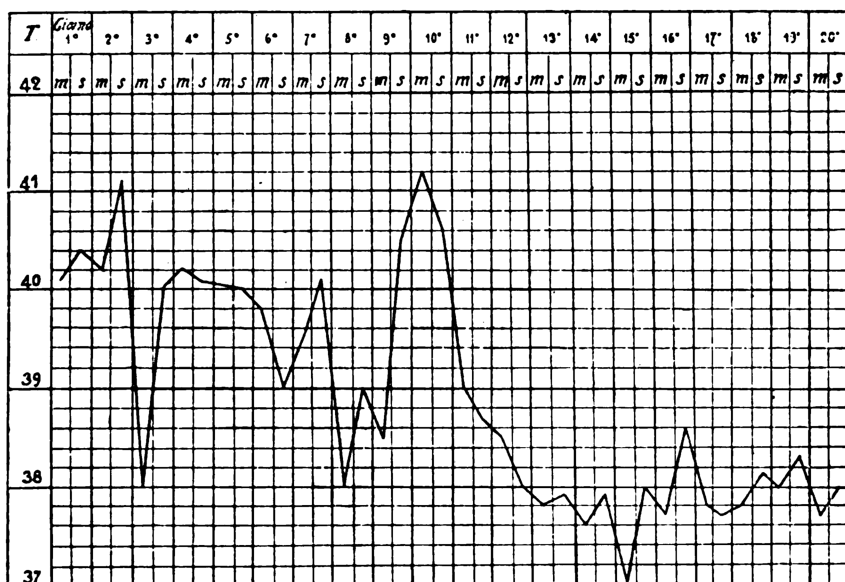
***Adinamia.* — Vi è notevole depressione delle forze, prostrazione, ottusità dei sensi più o meno considerevole.**

***Febbre.* — Il più spesso comincia bruscamente, qualche volta con brividi, e si eleva, fin dal primo giorno, a 39°.5-41° e più; in seguito può ancora salire fino a 42°-42°.5, mantenersi con remissioni ed esacerbazioni, per solito vespertine; la defervescenza ha luogo con una serie di oscillazioni discendenti. L'andamento della febbre non si presenta regolare (vedi i diagrammi); in qualche caso però abbiamo osservato accenni d'intermittenza a tipo terzanario, ed un rapido ritorno alla temperatura massima iniziale all'ottavo o nono giorno.**



(*) Il fatto che vari altri autori ebbero, nella prova di trasmissione della piroplasmosi equina con sangue infetto, risultati negativi, aggiunge valore alla osservazione dello Ziemann, e fa ritenere che probabilmente, anche nel caso da esso osservato, si fosse trattato di piroplasmosi.





Polso. — Frequente, irregolare, talvolta piccolo, impercettibile. I battiti del cuore, in alcuni casi, sono violenti e tumultuosi.

Respirazione. — Accelerata, nei casi gravi anelante, quantunque la percussione e l'ascoltazione toracica non facciano rilevare notevoli lesioni pleuro-polmonari.

Stato delle mucose. — Presentano una colorazione intensamente gialla, meno accentuata nei casi leggeri, che si osserva fin dal prin-

cipio della malattia; spesso sono cosparse di petecchie, di un rosso carico, di dimensioni variabili da quella di un grano di miglio a quella di una lenticchia o di una fava, talvolta confluenti, formando più estese macchie emorragiche. Nelle forme gravi, le palpebre sono quasi chiuse, le congiuntive di colorito itterico, edematose, ricoperte di petecchie, lasciano sfuggire una secrezione, talora di tinta giallastra o rossastra. Il giallore delle mucose persiste per qualche tempo, quando gli altri sintomi sono spariti.

Funzioni digerenti. — Gli animali rifiutano l'avena, e mangiano svogliatamente qualche po' di foraggio o di alimenti verdi. Assai spesso l'anoressia è completa.

Nelle forme gravi vi è diarrea, che dà alla malattia un decorso rapido; coliche intermittenti, che sono pure sintomo sfavorevole.

Urine. — In qualche caso vi è emoglobinuria precoce; spesso poi questo fatto si osserva negli animali durante il periodo che precede la morte.

Complicazioni. — Nel decorso della malattia si possono verificare congestioni polmonari e polmoniti lobari.

Nelle forme a decorso prolungato, si notano alterazioni a carico delle funzioni cardiache: polso venoso, aritmia cardiaca, qualche volta soffio sistolico, edema delle estremità e fatti di anasarca. Ci è avvenuto di osservare, durante la convalescenza, il manifestarsi di podoflemmatiti.

Durata. — La morte può avvenire in due o tre giorni e si può avere un decorso di varie settimane; la durata media è di 7-10 giorni.

Esito. — La mortalità differisce nelle singole epizoozie per varie circostanze. In qualche stagione, si presenta con forme molto gravi e la mortalità è rilevante, specialmente nei cavalli di razze distinte; altre volte estese epizoozie trascorrono quasi senza perdite. Può avvenire che, all'insorgere dell'infezione, coi primi calori estivi, molti cavalli muoiano, ma che in seguito i casi si diradino gradatamente e si presentino di preferenza forme benigne. Di novanta cavalli ammalati, ricoverati nel bimestre giugno-luglio 1904, nell'infermeria presidiaria di Roma, soltanto 5 morirono. In generale si può calcolare, che la mortalità avvenga nella proporzione del 6 al 12 per cento.

Cura. — In vari casi, ci parve di avere ottenuto buoni risultati, usando le iniezioni sottocutanee o endovenose di sali di chinina.

Predisposizione ed immunità. — Certamente i cavalli importati sono assai predisposti alla malattia e vanno più soggetti alle forme gravi. I cavalli nati od allevati nella campagna Romana generalmente vanno immuni; ma se cavalli importati vengono messi al pa-

scolo, come usano talvolta alcuni negozianti di vetture, durante l'estate, per diminuzione di lavoro, contraggono con grande facilità la malattia. Sembra che un primo attacco conferisca uno stato di immunità.

La malattia non si dimostra con caratteri di contagiosità.

Spesso abbiamo visto colpiti cavalli che vivevano nel più stretto isolamento; manifestarsi l'infezione saltuariamente nei reparti di truppa, in modo da non potersi logicamente dimostrare la propagazione da un animale ad un altro; non essere colpiti cavalli che cogli ammalati vivevano nel maggiore contatto. Abbiamo, ad esempio, osservato nella caserma del Macao, dove sono ricoverati i cavalli di un reggimento di cavalleria nei fabbricati di destra e di un reggimento di artiglieria nei fabbricati di sinistra, infierire su vasta scala l'infezione nel reggimento di artiglieria, e non manifestarsi neppure un caso, in tutta la stagione, in quello di cavalleria, quantunque non fossero cessati gli inevitabili rapporti del personale addetto ai cavalli dei due reggimenti (*).

ANATOMIA PATOLOGICA. — All'autopsia il fatto che maggiormente colpisce è l'anemia di tutti i tessuti, nascosta da un colorito giallo, che è più accentuato nei connettivi e sulle sierose.

La milza è ingrandita, la capsula tesa, il parenchima è facilmente lacerabile, talora diffluente, infiltrato da una grande quantità di sangue bruno-nerastro, che sfugge ad una leggera pressione. L'ingrossamento dell'organo è in rapporto alla durata dell'infezione. All'esame microscopico di sezioni di milza si osserva lo spappolamento emorragico dell'organo, per grandi lacune invase da emazie e per l'infiltrazione sanguigna nel tessuto.

Il *fegato*, per solito aumentato di volume, è ricco di bile e infiltrato di sangue, che si raccoglie alla superficie di sezione, che è di colorito rosso-bruno giallastro; la consistenza è diminuita.

All'esame microscopico di sezioni di fegato, si osservano altera-

---

(*) Il dott. N. Nelli, capitano veterinario dei Cavalleggeri di Catania ci scrive:

« Credo non inutile comunicarle un'osservazione fatta, per riguardo a diversi casi di febbre petecchiale, sviluppatisi nei cavalli del presidio di Ravenna.

« La pineta di Ravenna si presta moltissimo per cavalcate di piacere e per l'istruzione di reparti di armi a cavallo, per cui, anche nei mesi estivi, quando è piena di alati e non alati insetti, molti ufficiali vi si recano a cavalcare come pure lo squadrone cavalleggeri di Saluzzo, distaccato a Ravenna. Ora accadde che tutti i cavalli che furono in pineta ammalarono di febbre petecchiale, mentre non si ammalarono quelli che nella pineta non vennero mai condotti, quantunque fossero ricoverati nelle medesime scuderie, bevessero la stessa acqua, mangiassero il medesimo foraggio dei cavalli ammalati ».

zioni degenerative circoscritte a zone (atrofia, degenerazione vacuolare delle cellule epatiche) punti necrotici. Si osservano cellule con protoplasma torbido, granuloso, contenenti spesso granuli pigmentali gialli o giallo brunastri, ocracei.

L'intestino, di aspetto giallastro, con piccoli focolai emorragici disseminati.

I reni. — In alcuni casi si trovano ingrossati, iperemici, itterici, con infiltrazioni emorragiche circoscritte, specialmente alla mucosa del bacinetto e dei calici; le piramidi e i raggi midollari a tinta nerastra.

I polmoni sovente si trovano del tutto permeabili; qualche volta esistono congestioni ed infarti emorragici, nodi di polmonite ipostatica o di bronco-polmonite, punti gangrenosi.

Il cuore. — Miocardio anemico, flaccido; macchie emorragiche all'endocardio e al pericardio. Contiene qualche volta poco sangue disciolto; oppure coaguli molli e sangue disciolto.

Il sangue, che si ricava dal salasso coagula presto; ma il coagulo è poco consistente ed il siero ha una tinta giallo-bruna.

I *gangli linfatici* delle cavità sono tumefatti; i *muscoli* infiltrati di sierosità giallastra.

Esame del sangue. — Se da un animale ammalato si preleva un po' di sangue, questo appare più o meno alterato, a seconda del periodo della malattia.

Il momento più propizio per l'osservazione e lo studio dei parassiti è quello dell'esordio della malattia; abbassatasi la temperatura, torna molto difficile la loro constatazione. È facile invece rinvenire dei globuli rossi 2-3 volte più grossi dei normali, contenenti finissime granulazioni, colorate in turchino. Questi, che vanno sotto il nome di *corpuscoli rossi giganti punteggiati*, sembra debbano interpretarsi quali alterazioni degli eritrociti neoformati; essi sono stati osservati anche nella piroplasmosi bovina, nella malaria umana, nelle tripanosomiasi ed in altre malattie in cui vi è perdita rilevante di corpuscoli rossi, e primi Smith e Kilborne dicono d'averne sperimentalmente provocata la comparsa nel sangue di animali sani, assoggettandoli a ripetuti salassi.

L'apparizione di queste emazie giganti è ritenuta di una certa importanza, per il fatto che sembra stiano a rappresentare il segnacolo del trionfo dell'organismo infetto sul parassita. Nei cavalli ammalati di piroplasmosi abbiamo osservato gli *eritrociti giganti* solo nel periodo di apiressia, quando il sangue circolante non mostra più la presenza dei parassiti.

Fatto rilevante nei cavalli affetti da malaria, è il grado d'anemia a cui possono giungere: talvolta, pungendo l'animale per raccogliere il sangue, abbiamo veduto uscir fuori una goccia che per colore e fluidità rassomigliava più al siero che al sangue (*sangue lavato*) e che, distesa sui vetrini, mostrava pochissime emazie.

Il numero dei globuli contenenti i parassiti varia a seconda del momento in cui si fa l'esame del sangue ed a seconda della gravità della malattia: talvolta in molti preparati non si riesce a vedere più d'uno o due parassiti; mentre tal'altra il 50-60 % dei globuli sono infetti. Questi globuli poco differiscono dai sani; tutt'al più si può parlare di un minor contenuto in emoglobina; raramente si trovano ingranditi.

I parassiti si possono riscontrare anche nel plasma, fuori dei corpuscoli.

Parassitologia. — I parassiti endoglobulari della malattia da noi studiata, si possono vedere nei preparati di sangue a fresco: ma più facile ne riesce l'osservazione usufruendo di colorazioni specifiche. Essi assorbono con una certa difficoltà le sostanze coloranti e presto possono decolorarsi, sovratutto se il contatto col bagno colorante fu di breve durata.

A noi è riuscito, dopo numerose prove, fatte con tutti i metodi di colorazione finora proposti, di avere bellissime e stabili colorazioni con la miscela di Giemsa, lasciandola agire sui vetrini preparati, per 20-24 ore, alla temperatura della stufa.

Usando tale metodo, il citoplasma si colora in turchino chiaro, la cromatina in rosso violaceo.

I parassiti di cui parliamo non han tutti la stessa forma, nè le stesse dimensioni, nè lo stesso orientamento l'uno rispetto all'altro, quando trovansi in più d'uno in un medesimo globulo rosso.

Dal punto di vista morfologico, ci sembra opportuno dividerli in quattro gruppi principali:

a) *forme rotondeggianti;*
b) *forme allungate;*
c) *forme in via di scissione;*
d) *forme flagellate.*

a) *Forme rotondeggianti.* — A questo gruppo facciamo appartenere parassiti a contorno quasi rotondo od ovalare; meno frequenti sono le forme a contorno ondulato.

Il protoplasma è più o meno abbondante; talvolta esso appare omogeneo, tal'altra si intravede come un reticolo che in alcune forme prende aspetto regolare ed elegante (V. figure 18ª, 41ª, 42ª, 55ª,

60ª). Si riscontrano forme in cui la parte protoplasmatica è scolorata verso il centro; si ha così un solo alone colorato che può ridursi sottile al punto da rendersi appena visibile. In tal caso i parassiti assumono l'aspetto di un anello con castone rappresentato dal nucleo cromatinico; grande è qui la rassomiglianza cogli anelli delle febbri estivo-autunnali dell'uomo.

La cromatina, tanto in queste che nelle altre forme, varia, sia per quantità, che per modo di distribuzione. Essa è quasi sempre eccentricamente disposta sulla periferia del parassita costituendo, in certi casi, come un'appendice a bottone. (V. fig. 4ª).

Si possono osservare protozoi con un solo, con tre o con più blocchetti di cromatina di diverso volume, o la stessa può essere diffusa a falce, a semiluna o ad anello, presentando in qualche caso dei rigonfiamenti, sul contorno del parassita. Si osservano poi delle forme, specialmente le piccole, isolate, che forse stanno a rappresentare i *corpuscoli germi* di *Lignières* della piroplasmosi bovina, nelle quali appena si intravede un alone protoplasmatico (fig. 1ª).

Le dimensioni dei parassiti rotondeggianti sono varie, però non se ne riscontrano più grandi di 1/3 del corpuscolo rosso; i più piccoli misurano appena 1 μ. In genere si trova un solo parassita per corpuscolo rosso; ma non è affatto raro riscontrarvene due, tre ed anche quattro; una sola volta abbiamo osservato un'emazia, che conteneva bene evidenti sei piccoli parassiti.

Se poi riesce facile rinvenire delle forme grandi in quei globuli che albergano uno, due o tre parassiti, ciò non accade in quelli che ne ricettano di più, nel qual caso hanno sempre piccole o medie dimensioni.

L'orientamento dei piroplasmi l'uno rispetto all'altro, quando si trovano in più, in uno stesso globulo, è vario; caratteristico è l'aspetto di *trifoglio* che presentano i parassiti quando si trovano in tre, e quello a *rosetta*, a *croce di Sant'Andrea* e a *croce di Malta*, quando sono riunini in 4 in uno stesso corpuscolo. Talune emazie mostrano parassiti che sembrano abbandonare l'orientamento primitivo, per disporsi in fila verso la periferia (V. fig. 15 e 16).

b) *Forme allungate.* — Sono parassiti più o meno regolari, aventi per solito l'aspetto di elementi piriformi, clavati, romboidali, semilunari e bastonciniformi.

Il protoplasma e la cromatina si comportano in queste forme press'a poco come in quelle rotondeggianti.

Hanno quasi sempre medie o grandi dimensioni e talvolta si estendono per tutto il diametro del globulo rosso. Nella maggior

parte dei casi le forme a pera e a clava si vedono isolate; quando sono accoppiate, la parte affilata di un parassita è rivolta all'opposto di quella dell'altro (V. fig. 20 e 21).

In una emazia abbiamo rinvenuto 4 piccole pere (fig. 22); la parte affilata è rivolta verso la periferia del globulo, la cromatina radunata in un unico ammasso sulla parte rigonfia dei parassiti. Ci sembra degno di nota questo reperto: e non ci risulta che altri l'abbiano osservato.

Gli altri parassiti allungati sono quasi sempre isolati.

c) *Forme in via di scissione.* — Sono le forme parassitarie colte al momento di segmentarsi. La schizogonia può avvenire per la divisione di un parassita in due, in tre o in quattro. Così si riscontrano delle forme a 8 (fig. 34), nelle quali la cromatina è divisa in due nuclei che si allontanano sempre più dalla parte strozzata, per collocarsi alla periferia della parte rigonfia.

Si vedono inoltre dei parassiti a forma di *trifoglio* (fig. 35[a]), con tre nuclei di cromatina: tra le forme di scissione questi sono abbastanza frequenti; ma riesce difficile interpretarne la genesi. Probabilmente si tratta di un'atrofia parziale.

Si vedono infine con facilità delle forme a *rosetta*, a *croce di Sant'Andrea* e a *croce di Malta*, che non sembrano altro che parassiti colti nel momento di dividersi in 4 (fig. 36, 37, 38 e 39).

In tutte queste forme talvolta la cromatina è tanto abbondante, da mascherare il citoplasma.

Non è infrequente osservare nelle forme a rosetta un alone scolorato tutt'intorno ai parassiti (fig. 37).

Interessante è il reperto presentato dalle figure 65 e 66.

La figura 65 rammenta lontanamente la forma di un'incudine e sembra costituita dall'intima unione di due parassiti piriformi, per la loro parte rigonfia; due blocchi di cromatina spiccano nel corpo di fusione.

La figura 66 ha l'aspetto di due pere unite pei lati: la più grossa è munita di un flagello, sul quale si notano due granuli di cromatina. Non escludiamo la possibilità che in questo caso si tratti di una semplice sovrapposizione parassitaria.

d) *Forme flagellate.* — Sono le stesse forme rotondeggianti od allungate munite di uno o più filamenti a flagello. Non variano da quelle, nè per le caratteristiche del protoplasma e della cromatina, nè per le dimensioni. Frequentemente sono isolate, ma possono trovarsi accoppiate con un'altra forma flagellata o no.

I flagelli sono più o meno affilati e alcuni hanno un rigonfia-

mento terminale; la loro lunghezza varia da quella di una piccola punta, fino a 2-3 volte le dimensioni del parassita. Di frequente si osserva sul loro decorso uno o più blocchetti di cromatina (fig. 40, 45, 47, 48, 49, 51, 57, 61); altre volte la cromatina non risulta evidente. Ad ogni modo, a queste forme flagellate noi, per ora, diamo sovratutto un'importanza morfologica.

Abbiamo riscontrato parassiti con un sol flagello, più raramente con due ed in un sol caso con tre. I flagelli possono presentarsi diritti, ricurvi od ondulati; spesso raggiungono la periferia del globulo e possono sorpassarla, come abbiamo riscontrato in due casi, rappresentati dalle figure 64 e 67. Di quest'ultima è da notarsi il fatto che il prolungamento a flagello, fuoruscito dal globulo infetto, si estende fino sulla superficie del vicino.

Alcune forme flagellate che abbiamo osservato (fig. 52, 53 e 54) ricordano i tripanosomi, e fanno pensare al concetto di Schaudinn che i tripanosomi facciano parte del ciclo evolutivo dei piroplasmi, ed agli esperimenti di Battaglia (42), il quale, inoculando nelle cavie il tripamosoma *Vespertilionis* e *Lewisii*, ha osservato svilupparsi nel sangue di questi animali, fin dal primo giorno, forme amebiche intra ed extraglobulari, più o meno rotonde o piriformi e la forma intera di tripanosoma non comparire che poco prima della morte.

Di forme flagellate fuori dei corpuscoli, ne abbiamo osservate poche.

Forme miste. — In uno stesso globulo non è difficile poter riscontrare due o più parassiti di diversa forma: ad esempio uno rotondeggiante e l'altro allungato; l'uno atrico e l'altro flagellato, ecc. Esempi di tal genere si possono vedere nelle figure 62, 63 e 64.

Riguardo alla frequenza delle diverse forme nei preparati di sangue infetto faremo osservare che, in generale, predominano le forme rotondeggianti, il più delle volte di grandi dimensioni ed isolate; ma sono frequenti anche le allungate e le flagellate. Volendo disporre le diverse forme parassitarie per grado di frequenza, potremmo metterle in quest'ordine: forme rotondeggianti, forme allungate, forme flagellate, forme in via di scissione.

Diagnosi. — Sarà cosa importante delimitare clinicamente questa entità morbosa, bene differenziandola dalle altre malattie, e specialmente dalle affezioni tifoidi, colle quali andò sempre confusa.

A scopo diagnostico, gioverà più di tutto la ricerca dei parassiti nel sangue; avvertendo di eseguire tale ricerca all'inizio della malattia.

Il carattere clinico più saliente è il colorito giallo delle mucose apparenti, che si manifesta precocemente, in animali con febbre intensa e in stato generale grave, con formazione quasi costante di petecchie rosso-brune sulla congiuntiva, di aspetto particolare. Nelle affezioni tifoidi, invece, il colorito delle mucose si osserva generalmente rosso-mattone.

Altri caratteri differenziali sono: la minor frequenza di accidenti polmonari, che costituiscono invece la complicazione abituale delle affezioni tifoidi, e il frequente contenuto emoglobinico delle urine.

Inoculazioni negli animali. — Abbiamo aspirato per mezzo di una grossa siringa dalla giugulare di cavalli ammalati 10 cmc. di sangue, ricco di parassiti, e l'abbiamo inoculato nella giugulare di altri cavalli che, per quanto si sapeva, non avevano sofferto in precedenza l'infezione.

La malattia non si è riprodotta e l'animale non ha risentito alcun disturbo. Ciò del resto concorda colle osservazioni della maggior parte degli autori che si occuparono dello studio della piroplasmosi equina.

Il Theiler (43) in un ultimo lavoro afferma di essere riuscito a trasmettere la piroplasmosi ai cavalli, inoculandoli non solo col sangue di cavalli ammalati, ma eziandio col sangue di cavalli immuni, per essere guariti dalla malattia sofferta.

Noi pensiamo che i risultati negativi delle nostre prove di inoculazioni al cavallo, possano dipendere dal fatto che abbiamo usato, per gli esperimenti, due puledri provenienti dall'Italia meridionale (deposito allevamento di Persano) ed un puledro nato nel reggimento di artiglieria a Roma, per cui può darsi che godessero di immunità. Ci proponiamo di ripetere la prova, con cavalli provenienti da luoghi, dove, senza alcun dubbio, non esista la malattia.

Come avviene l'infezione naturale?

Finora si possono fare soltanto delle ipotesi. Il Guglielmi è propenso a credere che l'infezione possa avvenire per la puntura di un *anopheles* « della specie un po' restìa ad attaccarsi all'uomo, o di un *culicida* », ma in generale gli autori ammettono che si tratti di zecche, per analogia a ciò che avviene nella malaria bovina.

Bowill, ed Eassie dicono che, secondo ogni verisimiglianza, l'agente di trasmissione della piroplasmosi equina nell'Africa del Sud è il *Rhipicephalus decoloratus,* assai frequente sugli animali infetti. Theiler (43) afferma che da alcune sue ricerche, ancora inedite, risulterebbe che la piroplasmosi equina verrebbe trasmessa dal *Rhipice-*

phalus Evertsi, il quale prenderebbe l'infezione allo stato di ninfa e la comunicherebbe da adulto.

Nella considerazione che a Roma vengono colpiti dalla piroplasmosi cavalli tenuti con ogni cura in scuderie, lontani dalle località di riproduzione delle zecche, e sui quali difficilmente le zecche potrebbero attecchire per l'assiduo governo al quale sono sottoposti, abbiamo sospettato che l'infezione possa forse avverarsi per la puntura della *Hippobosca equina* (mosca cavallina), così frequente durante i calori estivi, quando appunto suole manifestarsi la malattia. Ma anche noi non possiamo, pel momento, portare a suffragio di questa ipotesi alcuna osservazione probativa. D'altra parte, abbiamo spesso osservato che la comparsa della malattia nelle scuderie, coincide colla somministrazione ai cavalli del fieno nuovo e dell'erba. Non sembra quindi improbabile che le giovani zecche, vengano trasportate nelle scuderie con questi foraggi dai prati infetti.

Considerazioni.

Il conoscere ora che la malattia da noi studiata è di natura protozoaria, ha una notevole importanza pratica, sia per riguardo al trattamento curativo, sia per riguardo alla profilassi, che avrà di mira specialmente la lotta contro gli ospiti intermedi, sorgenti e veicoli della infezione. Sarebbe molto utile poter definire quale sia, delle varie specie di insetti, dagli autori incriminate, quella che rappresenta l'ospite intermedio, e noi ci proponiamo di istituire ricerche in proposito.

Per la profilassi, si dovrà anche tentare qualche processo preventivo, che accresca l'indice di resistenza degli animali sensibili verso la malattia.

Abbiamo dato i criteri per delimitare, anche clinicamente, questa entità morbosa, differenziandola dalle altre forme, colle quali va confusa; rimane da stabilire quale sia l'area della *piroplasmosi equina* in Italia ed in Europa, e se sia uguale o diversa da quella dominante nell'Africa del sud, nel Madagascar, ecc.

Per ora, noi possiamo attestare con certezza che esiste in Roma e provincia; i lavori di Guglielmi e di Russi ci danno affidamento che sia frequente nell'Italia meridionale, e le nostre osservazioni cliniche personali ci inducono a ritenere che non siano immuni altre regioni dell'Italia centrale e settentrionale.

D'altra parte, l'osservazione dello Ziemann in Germania e il

quadro clinico ed anatomo-patologico che vari scrittori danno di certe forme tifose del cavallo in altri paesi d'Europa, fanno sospettare che l'area geografica della *piroplasmosi equina* sia molto estesa anche nel nostro continente. E su tale possibilità, ci permettiamo di richiamare l'attenzione dei ricercatori.

Conclusioni.

1. La malattia dei cavalli che, nella stagione estiva, domina nella città e provincia di Roma, fino ad oggi denominata *tifo*, *febbre tifoide*, *febbre petecchiale*, *influenza*, *pasteurellosi*, ecc., non è di natura batterica, ma è prodotta da un protozoo endoglobulare.

2. Non possiamo affermare che il parassita, da noi descritto nella detta infezione, sia identico al *piroplasma equi* di Laveran, che è causa della *malaria equina* nell'Africa del sud e in altri paesi tropicali, quantunque ne presenti i principali caratteri; avendo noi messo in evidenza forme parassitarie, dagli altri autori poco o mai osservate.

3. La *piroplasmosi equina*, da noi studiata, è differenziabile, anche clinicamente, dalle affezioni tifoidi del cavallo (*setticemie emorragiche*), colle quali viene confusa (*).

BIBLIOGRAFIA.

1. Servolès. *La fièvre typhoïde chez le cheval.* Thèse de Paris, 1883.
2. Nocard. Recueil de Médecine Vétérinaire, 1888, pag. 358.
3. Rivolta. *I parassiti vegetali.* Torino, 1873, pag. 127.
4. Dieckeroff. *Die Pferdestaupe.* 1882, Adam's Wochenschrift, 1881-83-85.
5. Siedamgrotski. Sächs, Jaresber, 1880.
6. Friedberger e Fröhner. *Pathologie et thérapeutique spéciales des animaux domestiques.* Paris, 1892, pag. 300, vol. 2.
   Id. *Lehrbuch d. vergleichenden Pathologie.* 5ª ediz., 1900.
7. Perroncito. *Enciclopedia agraria.* Torino, 1874-75.
   Id. *Sulle malattie più comuni degli animali domestici.* Torino, 1886, pagine 104-105.
8. Röll. *Lehrbuch der Pathologie und Therapie der Hausthiere.* Wien, 1876, pag. 500.
9. Galtier et Violet. *Les pneumo-entérites des fourrages, ou variétés des affections typhoïdes des animaux solipèdes.* Lyon, 1890.

(*) Ringraziamo sentitamente il prof. B. Gosio, direttore del laboratorio, per il cortese aiuto prestatoci, durante le nostre ricerche.

GALTIER. *Traité des maladies contagieuses.* 1892, vol. 2, pag. 649.
10. Enciclopédie Cadéac. *Pathologie interne des animaux domestiques.* Volume VI, pag. 313.
11. MICELLONE. *Circa la convenienza d'una più esatta distinzione di alcuni morbi.* Torino, 1885.
12. MORETTI. *Della febbre tifoide del cavallo.* Pavia, 1899.
13. LEVI. Lezioni di patologia interna e terapeutica clinica veterinaria. Milano, 1892.
14. BASSI e VENUTA. *L'anasarca idiopatico del Bouley o febbre petecchiale del cavallo.* Giornale della R. Società veterinaria. Torino, 1882, pagina 36.
15. BRUSASCO e BOSCHETTI. *Trattato di patologia e terapia medica comparata.* Vol. 1. *Malattie infettive.* Torino, 1902, pag. 1054.
16. LIGNIÈRES. *Etiologie de la fièvre thyphoïde du cheval.* Bulletin de la Soc. centr. de méd. vétérinaire, 1897, pag. 437.
ID. *Contribution à l'étude des pneumonies du cheval.* Id. id., pag. 450.
ID. *La pasteurellose equine.* Id., 1898, pag. 849.
17. BARUCHELLO. *Unicità delle affezioni tifoidi del cavallo.* Il moderno zooiatro, 1901.
18. NOCARD. *Les Pasteurelloses.* Leçon faite à l'Institut Pasteur de Paris. Revue générale de médecine vétérinaire, 1903, vol. II, pag. 188.
19. NOCARD e LECLAINCHE. *Les maladies microbiennes des animaux domestiques.* Paris, 1903, vol. 1, pag. 104; vol. 2, pag. 562.
20. BARUCHELLO e MORI. *Su una infezione protozoaria endoglobulare nei cavalli della provincia di Roma.* La Clinica veterinaria, 15 luglio 1905, pag. 157.
21. ZAFFUTO e BASAGLIA. *La « Pasteurellosi » nei cavalli del presidio di Roma.* Rivista di cavalleria. Roma, 1904.
22. DUPUY. *Malaria des chevaux algériens en Sénégambie.* Recueil de méd. vétér., 1888, pag. 535, e 1889, pag. 253.
23. POPOW. Petersburg. Archiv, 1892.
ID. *Sei casi di malaria nel cavallo.* La Clinica veterinaria, 1894, pag. 182.
24. PIERRE. *Du paludisme chez le cheval.* Bulletin de la Soc. centr. de méd. vétérinarie, 1896, pag. 148.
25. GUGLIELMI. *Un caso di malaria nel cavallo.* La Clinica veterinaria, n. 19-20, 1899, pag. 220 e 229.
26. LAVERAN. *Contribution à l'étude du piroplasma equi.* Société de biologie 20 aprile 1901, p. 385.
27. THEILER. *Equine malaria and its sequelae.* Journal of Comp. Path. and Therapeutics, 1902, vol. XV, p. 40-54.
28. THEILER. Journal of comparative Pathology and Therapeutics, 1903, Vol. XVI, p. 97 e 516.
30. DALE. The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, dicembre 1903, p. 312.
31. THIROUX. *Note sur l'existence de la Piroplasmose du cheval à Madagascar.* C. R. de la Société de Biologie, seance du 24 octobre 1903, p. 1188.
32. KOCH. *Rhodesian Investigations.* Cape Agricoltural Journal, Vol. XXIV, n. 6, june 1904.

33. Bowill. *Departmental Report to Chief Colonial Veterinary surgeon on Equine malaria.* 13 January 1904.

Id. *Equine piroplasmosis or biliary fever.* Journal of Hyg., vol. IV, 10 janvier 1905.

34. Edington. Col. Bact. Institute Report, 1901.

Id. *Further remarks on the production of Malarial form of Horse Sickness.* Journal of Hygiene, vol. IV, n. 1, p. 11.

Id. *Biliary fever in the horse.* Journal of comp. Path. and Ther., vol. XVII, mars 1905, p. 35-40.

35. Eassie. *Some observations on tropical biliary fever.* Journal of comp. Path. and. Ther., vol. XVIII, giugno 1905, p. 108-113.

36. Ziemann. *Zur Bevölkerungs und Viehfrage in Kamerun.* Deutsche Colonialblatt, n. 14, 1 giugno 1904.

37. Lingard et Jennings. *A preliminary note on pyroplasmosis fond in man and in some of the lower animals.* Ind. medic. Gaz., maggio 1904, p. 161-165.

38. Piot-Bey. VIII Congrès international de médecine vétérinaire, tenu à Budapest du 3 au 9 septembre 1905. Revue générale de méd. vétér., 1905, vol. VI, p. 424.

39. Guglielmi. *Un altro caso di malaria del cavallo ed ipotesi sul mezzo di trasmissione.* La Clinica veterinaria, dic. 1903 e genn. 1904.

40. Russi. Atti del V Congresso della Federazione veterinaria italiana Torino, 1902, p. 32.

41. Ziemann. Deutsche med. Wochenschrift, 1902, p. 385.

42. Battaglia. *Alcune ricerche sopra due tripanosomi.* Annali di medicina navale, 1904, vol. 2°, pag. 517.

43. Theiler. *Maladies des troupeaux dans l'Afrique du Sud.* Bulletin de l'Institut Pasteur, 30 agosto 1905.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I e II.

Tavola I. — Fig. 1-16. — *Forme rotondeggianti:* 1-6 isolate; 7-16 riunite a due, tre e quattro in uno stesso globulo

Fig. 17-33. — *Forme allungate:* 17-22, a pera; 23-33, a fuso, a rombo, a semiluna, a bastoncino.

Tavola II. — Fig. 34-39. — *Forme in via di scissione:* 34, in due; 35, in tre; 36-39, in quattro; 36-37 forme a rosetta; 38, croce di S. Andrea; 39 croce di Malta.

Fig. 40-61. — *Forme flagellate:* 40-57 monoflagellate; 58-59 biflagellate; 60 parassita con tre flagelli; 61, due parassiti monoflagellati in uno stesso globulo; 40, 45, 47, 48, 49, 51, 57, 61, forme flagellate, con granuli di cromatina lungo il decorso del flagello.

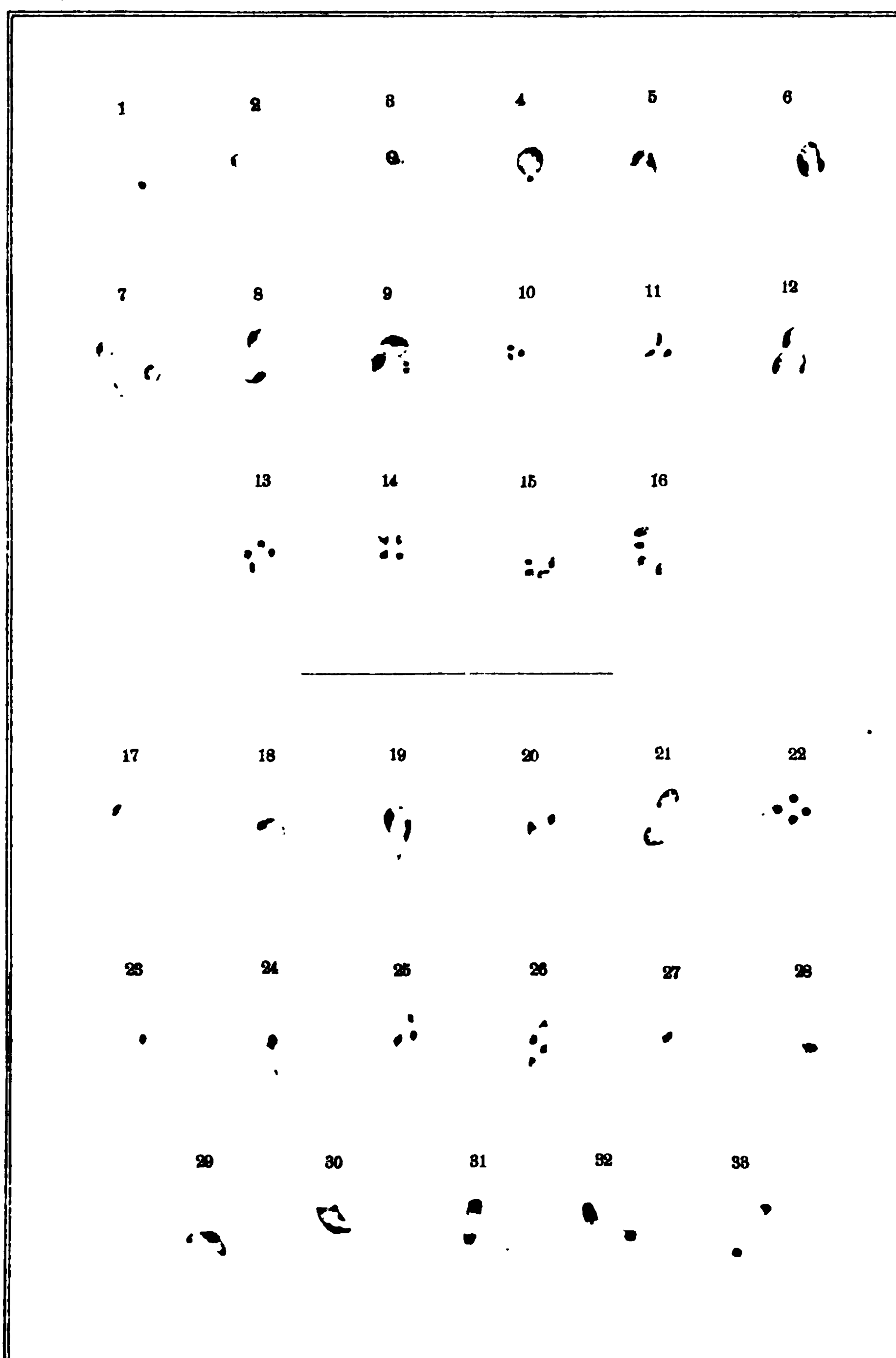
Fig. 62-64. — Forme miste.

Fig. 65-67. — Forma di coniugazione di due parassiti, o di bipartizione di un solo?

I preparati furono colorati col metodo di *Giemsa.* L'osservazione fu fatta con lenti *Zeiss* (immersione omogenea $^1/_{15}$, apert. 1,30, oculare compensatore 8).

Vol. XVI. — Tav. 1ª

Baruchello e Mori



I. Bardzki *dis.*

Lab. foto-lit. Minist. Guerra

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari — Istituto dermosifilopatico della R. Università di Catania

Se nei filtrati di manifestazioni sifilitiche ottenuti attraverso candele Berkefeld comuni, V, N, W, Chamberland F, si trovi l'agente dell'infezione.

Ricerche dei professori
O. CASAGRANDI — R. DE LUCA.

Fino a poco tempo fa quando ancora nessuna ricerca pareva avesse indicata la strada da percorrere per giungere alla scoperta dell'agente etiologico della sifilide, e succedevansi molteplici lavori tendenti a dimostrare che l'uno o l'altro batterio, o questo o quel protozoo, potevano esserne la causa, parve per un momento possibile che l'infezione in discorso potesse esser causata da un germe appartenente alla categoria degli *invisibili* od *ultramicroscopici*.

All'atto pratico le ricerche si presentavano però estremamente difficili ad eseguirsi, non foss'altro per la mancanza dell'animale su cui sperimentare l'attività del virus. L'uomo, essendo — allora — il solo sicuramente recettivo, la possibilità dell'esistenza di un essere invisibile nei prodotti sifilitici non poteva esser dimostrata con certezza che inoculando nell'uomo stesso il virus filtrato.

Tuttavia, ci accingemmo nel 1904 ad eseguire un piano di ricerche concretato sino dall'anno precedente. E se dopo aver impiantata quella parte di esse che dovevano convincerci della possibilità di procedere nel lavoro, ci furono subito noti gli esperimenti del Klingmüller e Baermann (1) che provarono su sè stessi il filtrato

(1) Deutsch. med. Woch., 19 maggio 1904, n. 21.

di varie manifestazioni sifilitiche e più tardi, a lavoro già inoltrato, quelle del Metschnikoff (1) che sperimentò sulle scimmie la sierosità filtrata delle manifestazioni sifilitiche primarie, gli uni e gli altri con risultati negativi, non per questo smettemmo il nostro lavoro, convinti che un contributo all'argomento, secondo il piano da noi incominciato a svolgere, non doveva esser trascurabile.

Siamo così giunti ad oggi senza far noto alcun particolare del nostro lavoro, ma crediamo di trovarci in un momento opportuno, dacchè, se l'agente dell'infezione sifilitica è lo *spirochete* di Schaudinn e Hoffmann, poteva sorgere il sospetto che lo si potesse trovare, come altri, in un dato stadio di vita, così ridotto di dimensioni da passare attraverso le candele che non si lasciano attraversare dai comuni batteri.

Ciò premesso, lo scopo di questo lavoro fu e rimase quello di vedere *se le manifestazioni luetiche primarie, secondarie, terziarie, convenientemente ridotte a poltiglia e diluite, filtrate attraverso le candele Berkefeld comuni, V, N, W e possibilmente altre candele (Chamberland F, Silberscmidt, Kitasato, Maassen), fossero ancora attive, cioè indipendentemente dai comuni batteri, contenessero degli esseri viventi ai quali potesse riportarsi la causa della sifilide* (2).

I.

Tecnica per ottenere i filtrati e materiale usato per le ricerche.

Descriveremo, prima di ogni altro, la tecnica seguita per mettere il materiale in condizioni di essere filtrabile e poi passeremo a descrivere i procedimenti cui ricorremmo per accertarci della sua attività od inattività.

---

(1) Congresso dermatologico di Berlino, 12-17 settembre 1904.

(2) L'idea di adire ad un piano di ricerche che mettesse in chiaro la possibile esistenza di un agente « ultramicroscopico », nell'infezione sifilitica, è del Casagrandi, cui spettano la preparazione del materiale atto ad eseguire gli esperimenti e le diverse prove di laboratorio di cui si parla nel presente lavoro.
Al De Luca spettano gli esperimenti sull'uomo atti a giudicare della mancanza del virus sifilitico nei filtrati. E' il De Luca che ha fornito tutto il materiale per il lavoro.

Il materiale appena raccolto veniva spezzettato in una capsula di Petri, mediante una adatta forbice curva, poi i frammenti si ponevano in un mortaio di porcellana rugosa e si trituravano insieme a quarzo sterile chimicamente puro, aggiungendo qualche goccia di glicerina neutra, per facilitare la triturazione. Quando il materiale si riteneva sufficientemente triturato, si passava a porzioni successive in un mortaino di agata e si continuava la triturazione sino a rendere il quarzo quasi impalpabile.

Si teneva quindi conto del volume approssimativo del materiale prima di triturarlo e si diluiva la poltiglia in modo da stabilire un rapporto, certo assai approssimativo, tra essi e il veicolo, di 1 a 10-50.

Come mezzo di diluizione si è data la preferenza ad una mescolanza a parti eguali di acqua salata (0.85 per cento di Na Cl) e di glicerina neutra dapprima e poi di glicerina 1 p. e acqua salata p. 4-25-30-40-50-60: però si è anche usato la sola soluzione fisiologica di cloruro sodico e la sola acqua distillata in qualche raro caso.

Tutte le volte che si è potuto non si son fatte trascorrere che poche ore dall'escisione della manifestazione alla sua filtrazione. Quando questo non fu possibile, il materiale esciso si conservava in glicerina pura neutra a bassa temperatura. Quest' ultima precauzione non si potè però prendere per il materiale che da Catania veniva spedito a Cagliari, durante il viaggio che necessariamente doveva fare: esso ad ogni buon fine veniva spedito chiuso in recipienti contenenti sola glicerina neutra.

Le candele adoprate per filtrare il materiale, erano naturalmente prima scelte fra quelle che poste in un vaso pieno d'acqua, dopo essersi bene imbibite del liquido, comprimendovi dentro dell'aria, non lasciavano fuoriuscire alcuna bolla che desse a sospettare sulle loro bontà.

Esse venivano raccordate mediante un corto e robusto tubo di gomma alla tubulatura laterale di una bottiglietta di vetro nel cui collo si introduceva un tappo di gomma ad un foro. A sua volta in questo foro si introduceva un tubo di vetro piegato a squadra, il quale nella sua porzione orizzontale portava una dilatazione la quale si riempiva di cotone.

Gomma, boccetta, candela, venivano una prima volta sterilizzate nella stufa di Koch separatamente avvolte in carta bibula, poi montato tutto l'apparecchio, ancora una volta nell'autoclave a 110°.

Il liquido da filtrare veniva posto in un piccolo recipiente tubulare, dentro al quale si introduceva la candela, in modo però da non immergerne l'attacco. In alcuni casi anzi, questo si scaldò alquanto e lo si circondò con mastice Archanson, onde usare il solo fondo e porzione della parete della candela: così si evitò che, diminuendo il liquido, la candela venisse allo scoperto nella sua parte alta ed entrassero delle bolle d'aria insieme al filtrato.

Solo per alcuni filtrati si adottarono altri dispositivi: uno di essi servì per i filtrati che dovevano inocularsi ripetutamente a diversi intervalli e sarà descritto in altro lavoro, l'altro lo usammo nelle prime ricerche fatte. E' questo quello che si adatta alle candele Berkefeld con collare di metallo. Il collo della candela si introduce in un foro posto nel centro del fondo di un cilindro e si costringe a rimanervi aderente per mezzo di un dado che si avvita al collo al di sotto del fondo del recipiente: naturalmente l'adesione si fa coll'intermezzo di un anello di gomma. Il resto del

collo si introduce poi nel foro di un tappo di gomma col quale si chiude il collo di una bottiglia a tubulatura laterale. Non abbiamo continuato ad adoperare questo apparecchio perchè il liquido viene facilmente in contatto coll'attacco del cappuccio delle candele, il quale può non esser perfetto, e poi perchè una parte di esso si perde: quello che rimane nel recipiente corrispondentemente all'altezza del cappuccetto metallico.

Per la montatura delle Silbersemidt introducevamo la candela entro un tappo di gomma a largo foro e poi innestavamo il tappo nel collo di un recipiente a tubulatura laterale. Identico procedimento abbiamo usato per le candele Maassen. Per diminuire la loro superficie filtrante adottammo un dettaglio di tecnica che abbiamo visto anche indicato da altri, cioè introducevamo nel fondo della candela un tappo di gomma a largo foro e in esso un tubo di vetro: così la superficie filtrante era solo quella del fondo della candela. Il liquido naturalmente veniva versato nell'interno del tubo.

Infine, anche le Kitasato vennero qualche volta introdotte entro un tappo di gomma e questo a sua volta introdotto nel collo di una bottiglia a tubulatura laterale: una porzione della candela si lasciava però fuori in modo da poterci innestare un tubo di vetro a mezzo di mastice di Archanson, il quale tubo di vetro fungeva da recipiente di raccolta del liquido da filtrare. Altre volte nello stesso modo si innnestarono quelle Berkefeld, coprendo con mastice l'attacco col tubo di gomma, e mai immergendo la candela nel liquido, sino a quel punto.

La filtrazione è stata sempre favorita dal vuoto che si otteneva per mezzo di una pompa Bunsen a caduta d'acqua con un impianto che permetteva a Catania di raggiungere un vuoto corripondente a 640 mm. di Hg, a Cagliari persino di 760. Eccezionalmente si ricorse alla pressione di 1 a 5 atmosfere usando l'apparecchio Gay-Lussac.

A seconda dei casi si è ottenuto il filtrato dopo pochi minuti, quasi mai dopo un'ora e più.

Da principio insieme al liquido da filtrare si emulsionava qualche patina di b. prodigioso, sviluppatosi da 48 ore su agar; in seguito questa prova si è fatta dopo finita la filtrazione.

Comunque il filtrato veniva sempre seminato in tubi di agar solidificato a becco di clarino, prelevandone 2-3 gocce con pipette sterilizzate e le semine venivano poste in termostato a 37°.

Tutti i filtrati ottenuti attraverso le candele che lasciavano passare il b. prodigioso, vennero, quand'era ancora possibile (e ciò accadde molte volte), adoperati per altri usi. Se con essi erano già stati fatti esperimenti importanti si pensò di tenerne conto solo nel caso che i loro risultati fossero stati negativi, nei riguardi dell'attività del virus.

Se i filtrati ottenuti erano abbondanti e si presumeva non si sarebbero adoperati tutti per ricerche immediate, si dividevano in adatti recipientini (fialette, tubetti sterilizzati), curando naturalmente nei travasi le norme necessarie per evitare che si inquinassero. Alcuni di questi recipienti si chiusero anche alla lampada.

II.

Esperimenti diretti a giudicare dell'attività dei filtrati.

Premettiamo che il materiale per le nostre ricerche, e sul quale contiamo in questa parte del lavoro, lo incominciammo a raccogliere verso l'agosto del 1904: quello raccolto nei mesi antecedenti ci servì per ricerche preliminari e di saggio i cui dettagli crediamo del tutto superfluo riportare.

Si tratta di sei manifestazioni primarie, due secondarie, una terziaria: in parte, del resto, è quello stesso materiale che ci è servito per un altro lavoro che pubblichiamo contemporaneamente (1).

Vogliamo qui intanto fermare l'attenzione sul fatto che prima di fare esperienze sull'uomo, ci siamo assicurati che i filtrati non avevano alcuna azione sulle cavie, sui cani, sui conigli, inoculandoli sulla cute scalfita, nelle vene, sottocute e nel peritoneo.

E pur potendo contare, a nostra garanzia, sui risultati del Klingmüller e del Baermann, solo dopo esserci convinti, nel luglio 1904, che le autoinoculazioni di saggio, fatte con filtrato assolutamente e rigorosamente amicrobico di sifilomi, erano innocue, ci sentimmo autorizzati a sistemare queste ricerche in modo da presentare un certo numero di esperimenti con *filtrati amicrobici* ottenuti attraverso varie specie di candele.

Ciò premesso, riferiamo senz'altro, gli esperimentie seguiti (2).

***

Con materiale di manifestazioni primarie si sono praticati due innesti sulla pelle del braccio scarificata di individui idonei:

L'uno con un filtrato ottenuto da un sifiloma ulcerato, del solco balanoprepuziale, triturato e diluito nella proporzione di 1 di filtrato a 30 di miscela glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 40 di NaCl al 0.85 %) dopo 1 ora e 45 minuti dalla escisione del sifiloma e 5 minuti di filtrazione.

---

(1) *Tentativi di profilassi e terapia antisifilitica coi filtrati amicrobici di manifestazioni sifilitiche.* Questi Annali, questo fascicolo.

(2) Teniamo qui a ringraziare il personale della Clinica dermosifilopatica di Catania, e particolarmente il primo assistente prof. Gravagna, per l'assistenza prestataci in questa parte del lavoro.

L'altro con un filtrato ottenuto da un sifiloma della pagina mucosa del prepuzio, triturato dopo tre giorni dacchè era stato esciso, conservato in glicerina, e diluito nella proporzione di 1 di materiale a 30 di miscela glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 30 di Na Cl al 0. 85%), dopo 1 ora di filtrazione.

Si trattò nel primo caso di un filtrato ottenuto attraverso una Berkefeld comune, nel secondo parte attraverso una Berkefeld comune, parte attraverso una Berkefeld V.

Oltre a questi innesti sulla pelle, abbiamo poi fatte quattro serie di iniezioni intraglutee:

La prima con 1 cmc. di filtrato di un sifiloma ulcerato del foglietto mucoso del prepuzio, ottenuto attraverso una Berkefeld W dopo 4 ore dalla escisione del sifiloma e 40 minuti di filtrazione, diluendo il materiale triturato nella proporzione di 1 di materiale a 50 di miscela glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 30 di Na Cl al 0.85%).

La seconda con 1 cmc. di filtrato di un sifiloma ulcerato del solco balanoprepuziale ottenuto attraverso una Berkefeld N, diluendo in precedenza il materiale triturato nella proporzione di 1 di materiale a 30 della miscela glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 60 di Na Cl al 0.85%), dopo 9 ore dall'escissione della manifestazione e 40 minuti di filtrazione.

La terza con cmc. 7, 10 in 15 giorni (praticando inoculazioni a giorni alterni, nei primi tre con 0.30, 0.40, 0.50 cmc. e nei successivi con 1 cmc.) di filtrato di un sifiloma ulcerato della ninfa sinistra, triturato e diluito in precedenza nel rapporto di 1 di materiale a 30 di miscela glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 4 di Na Cl al 0.85%) ottenuto pure attraverso una Berkefeld N, ma 23 giorni dopo la escissione del sifiloma, essendo stato quest'ultimo conservato in glicerina per tutto questo tempo.

La quarta con 1 cmc. di filtrato di un sifiloma ulcerato, già cicatrizzato, del foglietto mucoso del prepuzio, triturato e diluito nel rapporto di 1 di materiale a 50 di miscela di glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 50 p. di Na Cl al 0.85%) dopo 9 giorni dall'escisione del sifiloma con una filtrazione attraverso una Chamberland F alla pressione di 5 atmosfere, durata 37 minuti.

L'esito di queste inoculazioni fu identico in tutti i casi: esse non determinarono alcun fatto locale, nè alcun fatto generale, sia prossimo che remoto. E questo si può assicurare anche oggi che è trascorso più di un anno da queste prove.

Certamente, non nascondiamo che volendo sottoporre questi esperimenti ad una analisi fine, qualche dubbio potrebbe elevarsi sul loro valore; ma si tratta di dubbi assai relativi di fronte al risultato cui tutti quanti hanno condotto.

Si potrebbe tra l'altro pensare che l'inattività del virus nel filtrato potesse dipendere vuoi dalla triturazione cui si è ricorso per ridurre i sifilomi a finissima poltiglia, vuoi dalla diluizione del veicolo.

Quanto alla prima obbiezione, noi rispondiamo che se si fosse trattato di un virus ultramicroscopico, la triturazione probabilmente non l'avrebbe danneggiato nelle condizioni in cui è stata fatta, che sono proprio quelle che hanno condotto uno di noi a ridurre filtrabile la polpa vaccinica.

Quanto alla seconda obbiezione, abbiamo pensato che potevamo eliminarla concentrando il filtrato in modo da ridurlo a piccolo volume: il materiale si sarebbe nello stesso tempo trovato sospeso in sola glicerina, ossia in un liquido che si sa già conservare il virus sifilitico.

Il filtrato di un sifiloma integro del frenulo, triturato e diluito nelle proporzioni di 1 di materiale a 100 di miscela glicerico-acquosa (1 p. di glicerina e 10 e poi 25 di H^2O distillata per renderla più diluita) ottenuta attraverso una piccola Berkefeld comune, venne concentrato nel vuoto e su acido solforico, alla temperatura ordinaria, all'oscuro. L'operazione però durò 26 giorni, trascorsi i quali venne praticato l'innesto del concentrato sulla cute del braccio scarificata.

L'esito di questo innesto cutaneo fu del tutto negativo.

Certo questa prova nel senso da noi desiderato non è decisiva, perchè non eseguita con un filtrato recente: ad ogni modo, data la conservabilità del virus nella glicerina, noi propendiamo a credere parli più in favore del non passaggio del virus sifilitico nel filtrato che in favore del suo passaggio in condizioni di inattività.

***

Fin qui abbiamo riferite le ricerche fatte sulla filtrabilità del virus contenuto in manifestazioni sifilitiche primarie.

Quanto a quelle sulla filtrabilità dello stesso, contenuto nelle manifestazioni di altri periodi dell'infezione, si tratta di poche esperienze non essendo facile avere il materiale a nostra disposizione.

Abbiamo praticato le due seguenti inoculazioni intraglutee con:

1) 1 cmc. di filtrato di una grossa papula umida del grande labbro destro, dopo triturato il materiale e diluitolo nella proporzione di 1 di materiale a 20 di miscela glicero-acquosa (1 p. di glicerina e 50 di Na Cl al 0.85 per cento) e costrettolo a passare attraverso una Berkefeld *V*, facendo durare tutta la operazione 2 ore e 45 minuti e la filtrazione solo pochi minuti;

2) 1 cmc. di filtrato di porzione di papule ipertrofiche della zona anogenitale, ricavato nello stesso modo del precedente ma dopo 15 giorni dall'escisione delle manifestazioni, ripetendo però l'inoculazione 10 volte nel termine di 15 giorni.

Inoltre quest'ultimo materiale appena esciso, l'abbiamo subito in piccola parte triturato, diluito e filtrato attraverso una Berkefeld *V* e questo filtrato ottenuto dopo 6 ore dall'escisione della manifestazione e 14 minuti di filtrazione, l'abbiamo innestato sulla cute del braccio scarificata dello stesso individuo cui era stato inoculato il primo filtrato nei glutei.

Alcun fatto locale nè generale sia prossimo che remoto ebbe a notarsi neanche oggi dopo trascorso un anno dalle praticate prove.

***

Quanto alle prove col materiale di manifestazioni terziarie, possiamo riferire solo le seguenti:

Abbiamo inoculato nei glutei il filtrato di un frammento di infiltrazione sifilitica a nappo della cute della piega genitocrurale dopo averlo triturato e diluito nelle proporzioni di 1 di materiale a 20 di miscela glicero-acquosa (1 p. di glicerina e 30 di Na Cl al 0.85 per cento) ottenuto attraverso un Berkefeld *V* dopo 9 ore dall'escisione della manifestazione e 3 ore di filtrazione. Si inoculò subito cmc. 0.25 di filtrato e nei giorni successivi 1 cmc.: in tutto si vennero a inoculare cmc. 7.5 in 9 giorni.

L'esito prossimo e remoto locale e generale di quest'inoculazione fu del tutto negativo.

Anche quindi non volendo tener conto delle prove fatte con filtrati di vari giorni, e quindi limitandoci a prendere solo in considerazione quelle coi filtrati di poche ore, i risultati su cui contare si ricavano dalle prove fatte con:

1) tre filtrati di sifilomi dopo poche ore dall'escisione dei sifilomi, l'uno ottenuto attraverso un Berkefeld *V*, l'altro attraverso una *W* ed il terzo attraverso una Berkefeld *N*, dei quali il primo inoculato sulla cute del braccio scarificata e gli altri due nei glutei;

2) due filtrati di papule sifilitiche ambedue ottenuti attraverso due Berkefeld *V*, dei quali il primo inoculato nei glutei e l'altro sulla cute del braccio scarificata;

3) un filtrato di manifestazioni terziarie ottenuto attraverso una Berkefeld *V* inoculato nei glutei.

Essi ci autorizzano a ritenere che *il virus sifilitico non passa non soltanto attraverso le candele porose che non lasciano passare alcun batterio, come le Chamberland* F, *le Berkefeld comuni e le* W, *ma che non passa neanche attraverso le Berkefeld* N *e* V *facendo durare pochissimo la filtrazione materiale.*

E nel precisare che il passaggio del virus non avviene attra-

verso queste candele va aggiunto che esso non si avvera essendo favorito dal vuoto da ½ a 1 atm. per le Berkefeld e sino a 5 atmosfere di pressione per le Chamberland *F*, pure essendo il materiale ridotto nelle migliori condizioni di disgregazione e convenientemente diluito.

Crediamo quindi di essere autorizzati a dedurre che l'*agente etiologico dell'infezione sifilitica, come si trova nelle manifestazioni della malattia, non può appartenere alla categoria dei germi filtrabili, ultra microscopici o invisibili che dire si voglia.*

III.

Esame bioscopico dei filtrati.

Di pari passo con le prove dirette per mettere in chiaro la contagiosità o non del filtrato di manifestazioni sifilitiche, ne abbiamo fatte altre per scoprire a mezzo di indagini di laboratorio, la presenza di qualche essere vivente nei filtrati stessi, indipendentemente da quelle dei comuni batteri.

Procedemmo quindi ad esami microscopici di gocce pendenti dei filtrati stessi, a numerosi esami batteriologici, alla prova bioscopica del Neisser e Wechsberg.

Diremo senz'altro che gli esami microscopici diretti dei filtrati non ci hanno condotto ad alcun risultato e che gli esami batteriologici dei filtrati appena ottenuti, centrifugati e sedimentati e anche concentrati a 30° e nel vuoto, non ci hanno rivelato nulla, al di fuori, naturalmente, di quelli che contenevano qualche forma batterica, ossia di quelli che evidentemente, nonostante le precauzioni usate, si erano inquinati.

A risultati che meritano di essere riportati ci ha invece condotto la prova del Neisser e Wechsberg che uno di noi applicò per il primo alla ricerca dei germi ultramicroscopici nei filtrati di virus vaccinico (1) e la riferì tra i mezzi per mettere in evidenza germi invisibili nei liquidi che hanno attraversato le candele porose (2).

In una serie di tubetti sterilizzati lunghi cm. 10-15 e larghi 0.5, si faceva cadere a goccie la soluzione indicata dal Neisser e Wechsberg (cmc. 1

(1) *Studi sul vaccino*, Rif. Med., 1903, n. 31.
(2) *Batteriologia* nel vol. I, p. 470 del Manuale dell'Igienista di A. Celli (Soc. editr. Dante Alighieri, Roma, 1904).

della soluzione madre in 49 cmc. di Na Cl al 0.85 °/₀) (1) a mezzo di una pipetta sterilizzata e, al liquido, sempre a mezzo di altra pipetta sterile, si aggiungevano goccie del filtrato sterile. Quindi si copriva la colonnetta liquida di ciascun tubo con qualche goccia di olio di vasellina sterile.

I tubi si ponevano quindi nel termostato facendoli oggetto di osservazioni continuative per 1-12 ore e giorni anche a seconda dei casi.

Facciamo notare che le prove che più ci interessarono furono fatte al coperto da ogni possibile inquinamento esterno entro un'adatta cameretta che permette di lavorare in condizioni di assoluta sterilità (2).

Naturalmente volta per volta vennero posti in termostati tubetti di controllo contenenti la sola soluzione colorante, nonchè altri contenenti questa e pus o batteri per accertarci che il bleu di metilene, se vi fossero stati nel filtrato corpi capaci di ridurlo, l'avrebbero scolorato ed altri ancora, aggiungendo alla miscela colorante il numero di goccie di una miscela glicerico-acquosa corrispondente a quella di ciascun filtrato e qualche patina batterica o del pus.

E' ovvio perchè si fecero le due prime prove di controllo: quanto all'ultima, ebbe lo scopo di accertare se la miscela glicerico-acquosa usata per i filtrati inibisse di per sè la riduzione del bleu di metilene, dacchè alcune ricerche fatte con glicerina in varie diluizioni ci avevano condotto a trovare che la glicerina quando ha raggiunta una data concentrazione agisce precisamente inibendo il fenomeno.

Riportiamo in unico quadro le ossservazioni fatte:

---

(1) La soluzione madre è questa: bleu di metilene 1, alcool assoluto 20, Na Cl al 0.85 °/₀ 29.

(2) La descrizione di questa camera trovasi nel già citato Trattato di *Batteriologia*, a pag. 308 del I volume del *Manuale dell'igienista.*

MATERIALE con la data in cui fu raccolto	Candele usate	Età del filtrato	1 goccia di filtrato + gocce di miscela colorante	Riduzione del bleu di metilene tenendo il materiale a 35°-37°
23 luglio 1904 - Sifiloma ulcerato della ninfa sinistra	*N* *	3 ore	30	Ridotto al 3° giorno.
	N	23 giorni	30	Non ridotto all'8° giorno.
7 settembre 1904 - Sifiloma erosivo del prepuzio	*C*	3 giorni	15–30	Ridotto dopo 24 ore.
	V			
14 settembre 1904 - Sifiloma integro del solco balano prepuziale	*V*	12 ore	5–15–30	Non ridotto all'8° giorno.
28 settembre 1904 - Sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	*W*	2 ore e 30″	4-8–32	Ridotto dopo 24 ore.
17 ottobre 1904 - Idem	*W*	4 ore	2–4–8–32	Id.
21 ottobre 1904 - Sifiloma integro del frenulo	*C*	8 giorni	2–4–8–32	Non ridotto all'8° giorno.
	C	26 giorni	2–4–8–32	Id.
23 novembre 1904 - Sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	*V*	1 ora e 45″	2–4–8–32	Ridotto dopo 48 ore.
26 novembre 1904 - Sifiloma integro del solco balano prepuziale	*N*	2 ore e 40″	5–10–20–40	Non ridotto all'8° giorno.

* Le *N*, *V*, *W* sono candele Berkefeld: le *C* sono le Berkefeld comuni.

MATERIALE con la data in cui fu raccolto	Candele usate	Età del filtrato	1 goccia di filtrato + gocce di miscela colorante	Riduzione del bleu di metilene tenendo il materiale a 35°-37°
26 novembre 1904 – Sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	*W*	6 ore	5-10-20-40	Ridotto dopo 72 ore.
1 dicembre 1904 - Sifilomi ulcerati del solco balano prepuziale (due)	*N* e *V*	3 giorni	5-10-20 50	Ridotti dopo 16 ore.
11 febbraio 1905 – Idem (uno).	Kitasato	30 giorni	5-15-30-50	Ridotto dopo 48 ore.
	Silbersemidt	30 giorni	5-15-30-50	Ridotto dopo 24 ore.
	Maassen	30 giorni	5-15-30-50	Id.
3 marzo 1905 - Sifiloma ulcerato di recente cicatrizzato del solco balano prepuziale	Chamberland *F*	5 giorni	5-10-15-20-50-100	Non ridotto all'8° giorno.
25 agosto 1904 - Papule ipertrofiche perianali	*V*	2 ore e 15″	15-30	Id.
7 ottobre 1904 – Papule erosive del grande labbro destro	*V*	6 ore	5-15-30	Id.
11 agosto 1904 - Infiltrazione sifilitica a nappo, nodulo vegetante zona anale	*V*	9 ore	5-10-20-50	Id.

Basta considerare questo quadro per rimanere colpiti dal fatto che tutti i filtrati dei sifilomi ulcerati hanno ridotto il bleu di metilene 12-48-72 ore al più, dopo che i tubi erano stati nel termostato a 37°. I filtrati dei sifilomi integri e quello di un sifiloma cicatrizzato per converso sono rimasti sforniti di azione riducente. Lo stesso si dica di quelli delle due manifestazioni secondarie e della terziaria sperimentata.

I controlli fatti con la sola miscela colorante o con l'aggiunta di una o più gocce dell'identica miscela glicerico-acquosa del filtrato corrispondente, rimasero colorati. Quelli fatti, aggiungendo a questa ultima miscela ove un po' di pus, ove qualche po' di patina batterica, si sono ridotti nelle prime 12 ore.

Coi filtrati decolorati, abbiamo sempre fatti esami microscopici e colturali per assodare se la decolorazione fosse dovuta alla presenza nel liquido di qualche batterio inquinante. Così potemmo in qualche caso, fortunatamente raro, evitare di dar peso alla prova. Usando le precauzioni di fare a doppio e a triplo le mescolanze nei tubetti, potemmo altre volte, nonostante la perdita di qualche tubo, non infirmare l'esattezza dei dati che ricavavamo.

Possiamo quindi accertare che laddove la riduzione del bleu di metilene è stata determinata da un filtrato, la miscela colorante era perfettamente sterile e tale si mantenne. Epperò volendo, in questi casi, ricercare la causa della decolorazione di essa, diciamo subito, che, data la mancanza di quest'azione nei filtrati di sifilomi integri, del sifiloma cicatrizzato delle manifestazioni secondarie, è da mettersi da parte l'idea che possa esser stata determinata dal virus sifilitico passato nel filtrato.

Il fenomeno ha tutta l'apparenza di esser dovuto alla presenza nei filtrati di una sostanza riducente che per trovarsi nei soli filtrati di sifilomi ulcerati, o potrebbe essere di origine batterica o di origine leucocitaria, ciò che ci pare più probabile.

Non credemmo però, attesa la limitazione del fenomeno ai soli filtrati di sifilomi ulcerati, di addentrarci maggiormente in esso.

Anche senz'aggiungere altre indagini risultava dopo ciò evidente, che le decolorazione della miscela di Neisser e Wechsberg non era dovuta ad un virus invisibile esistente nei filtrati.

Riteniamo quindi di esser nel vero conchiudendo col dire che *con la prova del Neisser e Wechsberg diretta a ricercare germi ultramicroscopici nei filtrati di manifestazioni sifilitiche, non vi mette in evidenza la presenza di alcuno di essi.*

IV.

Prove siero-diagnostiche sui filtrati.

Ci pare opportuno di aggiungere alle ricerche ora esposte, alcune prove siero-diagnostiche dirette a mettere possibilmente in evidenza qualche cosa di specifico pei filtrati.

Praticammo perciò siero-diagnosi sui filtrati coi sieri di animali trattati e coi sieri dei sifilitici.

1. *Siero-diagnosi sui filtrati coi sieri di animali trattati.* — Riflettemmo anzitutto che inoculando ripetutamente filtrati di manifestazioni sifilitiche negli animali, si potevano provocare nel siero di questi animali proprietà precipitanti o agglutinanti sopra il materiale contenuto nei filtrati stessi o sospeso o sciolto.

Perciò abbiamo sottoposto a questo trattamento un grosso coniglio e una grossa cavia in periodi diversi (quando avevamo a disposizione del filtrato che ci rimaneva inutilizzato) e poi anche un grosso cane.

Il siero del coniglio e della cavia ci è servito per una serie di prove preliminari che non riportiamo, quello del cane per le prove definitive.

L'animale si inoculò per tre volte con un filtrato ottenuto attraverso una Berkefeld N, e poi per cinque volte con un filtrato V. Si incominciò dall'inoculare cmc. 30 e si salì sino a 60 cmc. alla terza inoculazione; si scese di nuovo a 35 e poi si risalì alla sesta inoculazione a 55 cmc., e finalmente una terza volta si scese a 20 cmc. e si risalì a 50 cmc. alla fine. La prima iniezione fu fatta il 27 marzo, l'ultima il 7 maggio. In questi 40 giorni l'animale ebbe fatte 9 iniezioni e inoculati in totale 370 cmc. di filtrato.

Il 10 maggio, cioè tre giorni dopo l'ultima inoculazione, il cane fu salassato, usando tutte le cautele perchè si potesse aver garanzia dell'assoluta sterilità del siero. Le stesse precauzioni si usarono per distribuirlo in tubi sterili e nel fare le mescolanze con i filtrati.

Si cercò sempre di ovviare ai possibili inquinamenti, usando pipette, vasi, ecc., assolutamente sterili, ed essendo rapidi nel fare le mescolanze. Si ebbe anche la precauzione di ripetere ciascuna prova fino a tre volte in modo da poter scartare quei tubetti che eventualmente si inquinassero.

Esponiamo i risultati nella tabella seguente:

DATA delle prove	Candela con cui si ottenne il filtrato	Rapporto volumetrico tra siero e filtrato	Risultato
15 maggio 1905 .	*V*	1 : 1	Dopo 24 ore a 37° il liquido rimane limpido: guardando con una lente sembra che ci sia un lieve deposito lungo le pareti e al fondo. Dopo 72 ore a 37° gli stessi fatti: il deposito sembra vedersi anche ad occhio nudo, ma è appena percettibile.
	»	2 : 1	
	»	5 : 1	
	»	1 : 2	
	»	1 : 5	
19 maggio 1905 .	»	1 : 1	Gli stessi fatti osservati nelle prove precedenti.
	»	2 : 1	
	»	5 : 1	
	»	1 : 2	
	»	1 : 5	
21 maggio 1905 .	*N*	1 : 1	Dopo 24 ore a 37° / » 48 » / » 72 » — Si rimane indecisi se ci sia o no un deposito
	»	2 : 1	
	»	5 : 1	
	»	1 : 2	
	»	1 : 5	
15 maggio 1905 .	..	Solo siero	Gli stessi fatti osservati nel filtrato *N*.
19 id. .	..	Id.	
21 id. .	..	Id.	
15 maggio 1905 .	..	Solo filtrato *V*	Nessun deposito.
19 id. .	..	Id.	
21 id. .	..	Solo filtrato *N*	

Sebbene il deposito, invero appena percettibile, formatosi nelle mescolanze tra siero e filtrato, fosse identico a quello formatosi nei tubi contenenti solo siero e quindi non si potesse dargli alcuna importanza, abbiamo fatto l'esame di questi depositi in preparati a goccia pendente e in preparati colorati col bleu di Löffler e con la fuxina carbolica, e in questi ultimi tempi anche con lo stesso metodo che ad uno di noi era servito a mettere in evidenza granula-

zioni piccolissime nei filtrati vaccinici, cioè fissando prima il materiale col metodo di Retzmann e poi colorando coll'azzurro II e l'eosina o anche con la semplice fuxina fenica (1).

In ogni caso nulla abbiamo trovato che fermasse la nostra attenzione e che potesse farci sospettare la presenza di qualche essere nei filtrati stessi (2).

Abbiamo anche seminata qualche goccia del contenuto dei tubetti dove ci pareva fosse del deposito, in brodo sterile contenuto entro tubetti di vetro chiusi da membrane di collodion, sterili anche essi, e abbiamo chiusi questi tubetti alla lampada, e poi introdotti nel peritoneo dei conigli.

È stata triplice la serie di questi innesti nel lasso di tempo di circa tre settimane; non le riportiamo dacchè tutti i tubetti rimasero sterili. La prova, a dir vero, non servì che a dimostrare l'eccellente tecnica adottata, con la quale si evitò qualsiasi inquinamento.

Del pari senza alcun risultato fu la prova eseguita aggiungendo al brodo entro i tubetti di collodion, innestato col filtrato, del siero di animale trattato con filtrato. Dal contenuto del tubetto nulla si precipitò di ben dimostrabile sia ad un esame macroscopico che ad un esame microscopico. Il tubetto rimase nel peritoneo del coniglio 5 giorni.

2. *Siero-diagnosi sui filtrati coi sieri dei sifilitici.* — Tutte le volte che vennero escise delle manifestazioni sifilitiche, si aveva cura di raccogliere del sangue entro tubetti affilati ad un estremo e dall'altro chiuso con un poco di ovatta.

Questi tubi si portavano in sito, avvolti in carta bibula, dopo naturalmente averli sterilizzati e, giunto, il momento opportuno se ne avvicinava l'estremo affilato alla superficie sanguinante, tenendo il tubetto inclinato in modo che il sangue vi potesse penetrare per capillarità e gravità. Così lo si lasciava riempire per un certo tratto, quindi se ne chiudeva l'estremo alla lampada. L'operazione veniva fatta in modo che nessuna bolla d'aria mai interrompesse la colonnina di sangue. Si mettevano quindi i tubi diritti in luogo fresco o si centrifugavano e al momento di servirsene si faceva un'intaccatura con una lima al disopra del menisco del siero. Si rompeva il tubo con un colpo secco e vi si introduceva l'ansa di platino sterilizzata

---

(1) Comunicazione alla Soc. dei cultori delle sc. med. e nat. di Cagliari, seduta 28 giugno 1905 (v. Policlinico, Sez. pratica, n. 33, 1905).

(2) Facciamo notare che le nostre osservazioni sono state fatte servendoci anche di fortissimi ingrandimenti: a Catania usando un obbiettivo apocromatico ad immers. omogenea 2 mm. con 1.50 di ap. numerica, della ditta Zeiss; a Cagliari un obbiettivo apocromatico ad immers. omogenea 2 mm. con 1.30 ap. numerica, della ditta Koristka. Naturalmente usammo gli oculari compensatori.

o l'estremo di una sottilissima pipetta capillare pure sterilizzata a seconda che si dovevano fare solo prove a goccia pendente o anche nei tubi.

In altri casi, quando l'escisione della manifestazione non si potè eseguire, abbiamo punta la lesione dopo aver cercato di pulirla bene, nella sua parte sana e raccolto un poco di sangue in tubi da linfa sterili.

Finalmente quando neppure questo è stato possibile, abbiamo raccolto nello stesso modo il sangue dal dito dell'infermo: soltanto, attesa la possibilità di pulire meglio la cute, in questi casi abbiamo avuta maggior garanzia di raccoglierlo sterile (1).

Di 16 sieri di sifilitici con manifestazioni primarie ne rimasero sterili 8, di cui 6 contenenti sangue raccolto dopo l'escisione delle manifestazioni e 2 contenenti quello ricavato dalla puntura delle stesse. Di due sieri di sifilitici con manifestazioni secondarie, rimase sterile un sol tubo su tre contenenti sangue raccolto dalla puntura della manifestazione di uno dei due casi. Di 7 sieri di terziari raccolti tutti dalla puntura del dito, ne rimasero sterili cinque. Potemmo quindi contare su 14 sieri sterili dei 25 raccolti.

Con questi sieri sterili furono fatte le prove sierodiagnostiche aggiungendoli entro tubetti, ai filtrati. Quando la quantità del siero fu piccolissima usammo diluirlo in brodo sterile: negli stessi rapporti naturalmente diluimmo i filtrati. Quando ci fu possibile curammo anche di porre in termostato un tubetto di solo siero con l'aggiunta di una quantità di brodo sterile corrispondente a quella del filtrato aggiunto agli altri tubi.

Sebbene queste prove ci siano costate tempo e pazienza, non le riportiamo, dacchè il risultato loro fu sempre identico tanto nei tubi con siero e filtrato, quanto in quelli di solo siero. Un leggero deposito, pur rimanendo sterili le mescolanze, si formava in tutti i tubi, ma esaminandolo al microscopio era evidente che esso era costituito dai detriti degli elementi cellulari, dei corpuscoli bianchi nella massima parte, disgregatisi. Epperò chiudemmo anche questa serie di esperienze, che qui abbiamo riportata in sunto, persuasi che nulla di specifico c'era nella prova sierodiagnostica.

Possiamo quindi concludere col ritenere che la *prova sierodiagnostica, fatta mescolando ai filtrati di manifestazioni sifilitiche siero di animale trattato con i filtrati stessi, come quella fatta mesco-*

(1) E' quasi tutto materiale degli stessi casi che ci servirono per le ricerche batteriologiche che riferiamo nel lavoro dal titolo « Sopra un reperto batteriologico costante di alcuni sifilomi ulcerati: *Bact. Syphylomatis ulcerosi* » di prossima pubblicazione nel Giornale italiano delle malattie veneree e della pelle.

lando nei filtrati siero di sifilitici primari, secondari e terziari, non mette in luce alcun dato che possa far sospettare nei filtrati la presenza di un materiale specifico.

V.

Inoculazioni endocorneali.

Sebbene i fatti messi in chiaro fossero tali da poter escludere che nei filtrati delle manifestazioni sifilitiche si trovasse l'agente dell'infezione sifilitica, non volemmo lasciare intentata un'altra prova cui recenti ricerche del Siegel avrebbero attribuito importanza addirittura specifica, l'inoculazione endocorneale dei filtrati stessi.

Le emulsioni di condilomi, sifilomi, di manifestazioni papulopustolose in glicerina innestate nella cornea dei conigli, determinerebbero la produzione di *cythoryctes* come quelli che si producono nella infezione vaccinica. Il Siegel ritenne questi corpuscoli specifici della infezione sifilitica tanto da denominarli *Cythoryctes luis* (1).

Per la tecnica delle inoculazioni siamo ricorsi ai più diversi procedimenti: all'innesto per semplice scarificazione dell'epitelio, per tasche endocorneali, per le une e le altre e successiva chiusura delle palpebre, per 24 ore, dopo avervi introdotto dentro un batuffolo di ovatta impregnato di filtrato.

Abbiamo così sperimentato due filtrati di 3 ore, uno di 7 e uno di 5 ottenuti tutti attraverso candele Berkefeld *V*, sei filtrati di non meno di 3 giorni ottenuti attraverso le Berkefeld *W*, due ottenuti attraverso le Kitasato dopo 9 ore e uno ottenuto dopo 7-10 ore parte attraverso ad una Berkefeld *N*, parte attraverso ad una Silberscmidt, parte ad una Chamberland *F*, parte attraverso una Maassen. I filtrati appartenevano tutti a sifilomi: solo quello attraverso le ultime candele Berkefeld *N*, Chamberland *F*, ecc., apparteneva a manifestazioni secondarie.

Infine, tutte le volte che ci rimase un dubbio sulla presenza di qualche materiale nei filtrati, comunque trattati, abbiamo fatto l'innesto endocorneale dello stesso. Quindi abbiamo innestato nella cornea i filtrati con aggiunta di siero di animali trattati e di sieri di sifilitici, il contenuto dei sacchetti di collodion contenenti brodo innestato con filtrato con l'aggiunta di siero di cane trattato.

---

(1) Unters. ü. d. Aetiologie d. Syphilis: Munch. med. Woch., 9 mai 1905, p. 915.

Sono stati 28 conigli così inoculati in varie epoche, e nelle cui cornee non abbiamo potuto notare alcuna lesione che avesse analogia con quella vaccinica.

Da vari di essi dopo 48-72 ore abbiamo estirpati gli occhi. Fissatili e sezionatane la cornea l'abbiamo colorata con l'ematossilina, col metodo del Weigert e con qualche altro procedimento (tionina fenica ecc.) (1), ma mai ci è stato possibile mettere in evidenza il reperto che altri dice di aver ottenuto col virus sifilitico.

Nessuna forma di *cythorycles* abbiamo potuto osservare (2).

Non hanno quindi determinata la formazione di cythoryctes nelle cornee dei conigli: i filtrati di sifilomi primari ottenuti attraverso le Berkefeld V *e* W, *di manifestazioni secondarie attraverso le* N, *di sangue di primari e secondari ottenuti attraverso le Kitasato, le Maassen, le Chamberland* F, *le Silberscmidt, i filtrati aggiunti con sieri di animali trattati e con sieri di sifilitici, le colture dei filtrati in brodo nei sacchetti di collodion, ecc.*

VI.

Ricerche sul sangue dei sifilitici.

Con ciò che abbiamo ora finito di esporre potevamo ragionevolmente dire di essere giunti alla fine del nostro lavoro.

Risultava evidente dalle prove fatte che l'agente dell'infezione sifilitica non si trovava nel filtrato delle manifestazioni.

Non avevamo però studiata la stessa questione sul sangue dei sifilitici. Se il germe infatti invece che nelle manifestazioni fosse stato nel sangue o almeno fosse più agevole trovarlo in questo materiale?

Certo non era più il caso di pensare a fare esperimenti sull'uomo. Nelle manifestazioni escise triturate e filtrate era logico ammettere vi fosse incluso del sangue: un po' di esso ne accompagnava del resto sempre i frammenti, tanto che il liquido filtrato appariva per lo più alquanto gialliccio.

Limitammo quindi le nostre ricerche a prove sierodiagnostiche e ad innesti corneali nei conigli.

---

(1) Sentiamo il dovere di ringraziare la dott. Rossi per l'aiuto che ci ha prestato in queste ricerche istologiche.

(2) Si noti che contemporaneamente uno di noi sperimentava sulle cornee dei conigli il vaccino filtrato e non filtrato e quindi aveva a sua disposizione molto materiale che poteva servire di controllo.

Cominciammo col preparare conigli coi filtrati dei sangui dei sifilitici e su questi filtrati facemmo agire il siero del sangue degli animali trattati.

Per ottenere i filtrati dai sangui, insieme ai tubetti di vetro che li contenevano li triturammo in mortaio con quarzo ed un po' di glicerina operando nello stesso modo col quale trattammo le manifestazioni sifilitiche. La poltiglia ottenuta venne diluita nella miscela glicerico-acquosa (1 di glicerina, 25 di Na Cl al 0. 85 %) nelle proporzioni molto approssimative di 1 di materiale a 30-50 di miscela. Quindi venne filtrata attraverso candele Berkefeld *V* ed *N*: credemmo inutile servirci delle *W*, pronti a ricorrerci nel caso in cui i filtrati attraverso le *V* e le *N* ci avessero messo in chiaro qualche particolare interessante.

Quanto agli animali preparati coi filtrati di sangue, furono tre: l'uno con filtrato di sangue di sifilitico primario, l'altro con filtrato di sangue di sifilitico secondario e il terzo con filtrato di sifilitico terziario, e ciò per avere dei sieri possibilmente specifici per i sangui di sifilitici nei tre periodi dell'infezione.

La durata del trattamento variò a seconda delle circostanze: il più lungo fu quello cui si sottopose il coniglio inoculato col filtrato di sangue di primario, il più corto quello cui si sottopose il coniglio inoculato col filtrato di sangue di terziario. Si dovette in questi ultimi due casi contentarsi di un minor numero di inoculazioni, perchè il materiale su cui fare agire il siero che avevamo a disposizione sarebbe diventato vecchio, mentre noi volevamo sperimentare possibilmente in condizioni adatte per giungere a deduzioni esatte.

Del resto ecco il diario degli esperimenti, dai quali si può anche rilevare la quantità di filtrato inoculato volta a volta e l'andamento del peso dell'animale.

Num. conigli	DATA dell' inoculazione	FILTRATO di	Cmc. di liquido inoculato sottocute	Andamento del peso dell' animale — gm.	Osservazioni
I	19 gennaio 1905. .		2	1783	
	21 id. . .		5	1610	
	27 id. . .		10	1580	
	30 id. . .	Sangue di sifilitici nel periodo primario ottenuto attraverso una Berkefeld *V*	10	1605	
	3 febbraio 1905. .		10	1550	
	5 id. . .		10	1620	
	10 id. . .		10	1570	
	14 id. . .		15	1565	
	17 id. . .		20	1675	
	21 id. . .		—	—	salasso
II	19 gennaio 1905. .		4	1520	
	23 id. . .		10	1455	
	27 id. . .	Sangue di sifilitico nel periodo secondario ottenuto attraverso una Berkefeld *N*	10	1490	
	30 id. . .		15	1430	
	3 febbraio 1905. .		15	1430	
	5 id. . .		10	1422	
	11 id. . .		10	1400	
	15 id. . .		—	—	salasso
III	17 marzo 1905 . .		5	1638	
	19 id. . .	Sangue di sifilitici nel periodo terziario ottenuto attraverso una Berkefeld *V*	10	1571	
	21 id. . .		10	1560	
	25 id. . .		10	1560	
	27 id. . .		10	1520	
	29 id. . .		—	—	salasso

Le prove sierodiagnostiche fatte furono le seguenti:

1. *Mescolanze del siero dei 3 conigli al sangue dei sifilitici triturato e filtrato.*

Queste prove furono fatte in tubetti. Con pipettine sterilizzate si prelevavano goccie di siero è si aggiungevano a goccie di filtrato prelevate nello

stesso modo e fatte pervenire in tubetti sterilizzati. E, per meglio garantirsi dagli eventuali inquinamenti, si usò la cameretta già ricordata a pag. 32. Le diluizioni si fecero nei rapporti di 1 a 5; 1 a 25; 1 a 50; cioè in 3 titoli diversi.

2. *Mescolanze del siero dei 3 conigli al sangue dei sifilitici semplicemente diluito.*

Per ovviare alla possibile obbiezione che i risultati delle prove precedenti risultassero negativi per le manipolazioni di triturazione e di diluizione cui si sottoponeva il sangue, le abbiamo ripetute sul sangue di sifilomatosi non triturato nel mortaio ma semplicemente diluito, e come veicolo diluente abbiamo adoperato la miscela glicerico-acquosa fatta con 1 p. di glicerina e 25 di Na Cl al 0.85 %, la soluzione di Na Cl al 0.85 %, la sola glicerina, l'acqua distillata. Siamo così riusciti ad avere 4 liquidi che abbiamo filtrati attraverso 4 Berkefeld *V*.

Le prove sierodiagnostiche furono fatte nello stesso modo delle precedenti, nei tubetti; però parallelamente ne facemmo anche a goccia pendente con la tecnica del Valagussa che ricorderemo fra poco a proposito di altre ricerche.

Tanto le prime quanto le seconde prove condussero agli identici risultati.

Nulla si potè vedere nelle gocce pendenti che fermasse l'attenzione se ne togli le solite fine granulazioni forse tutte di origine leucocitaria.

Nei tubetti lasciati a sè a 37° per 3 giorni nulla, assolutamente nulla di particolare, di sospetto fermò la nostra attenzione. Crediamo quindi inutile dilungarci in elenchi di osservazioni come abbiamo fatto in altre parti del lavoro.

Con tutto ciò da alcuni di questi tubetti aspirammo il liquido con una pipetta tirata a tubo capillare, e la raschiatura delle pareti fatta con una piccola lancetta la innestammo nella cornea di un coniglio. Al terzo giorno estirpammo gli occhi e li fissammo. A tempo debito fatte le sezioni e coloratele con ematossilina nessun *cythoryctes* si rinvenne.

Cosicchè abbiamo concluso col ritenere che *la prova sierodiagnostica sul sangue dei sifilitici filtrato, eseguita col siero di animali trattati coi filtrati, nulla mette in evidenza che possa far pensare che nel filtrato si trovi l'agente dell'infezione.*

***

A queste prove rimaneva però da aggiungerne un'altra, la quale, oltre a servire di controllo alle due precedenti, avrebbe potuto aprire la via a ricerche d'altro genere. Si doveva cioè fare la prova

sierodiagnostica con il siero dei tre animali trattati col siero dei sifilitici non filtrato.

E pure trovandoci in condizioni di possedere un siero di coniglio non più recente ci accingemmo a questa ricerca dacchè ci rimanevano ancora alcuni sieri di sifilitici del tutto sterili. Quattro erano stati raccolti dopo l'escisione di un sifiloma, il quinto dalla puntura di un sifiloma integro.

Le prove furono fatte a goccia pendente usando vetrini e vasellina sterile e per maggior rapidità di tecnica, non trattandosi di dover fare dosaggi, si ricorse a quella del Valagussa per la tiforeazione. Con una cruna d'ago n. 6 della filiera inglese, spezzata e quindi fatta a forchetta, si raccoglieva il siero di sangue di sifilitico introducendo la cruna stessa sterilizzata alla fiamma e raffreddata entro il tubetto in cui si trovava il sangue coagulato e centrifugato, badando di immergerlo nel solo siero. Quindi la cruna si sbatteva un po' entro un'ansa del siero di coniglio trattato, già prelevata con l'ago di platino e deposta sopra un vetrino coproggetti sterilizzato.

Ad evitare inquinamenti tutte queste manipolazioni furono fatte entro la cameretta già indicata più volte e così le successive per completare la preparazione della goccia pendente.

Aggiungiamo ancora che furono fatti tutti i controlli con gocce pendenti di solo siero, e che i rapporti usati furono di 1 a 1; 1 a 2; 1 a 3; 1 a 5.

Ecco del resto riferite in un quadro le prove fatte.

Numero prove	PROVENIENZA ed età del siero sifilitico	Numero anse siero animale	Numero anse siero sifilitico	*Osservazioni* delle goccie pendenti tenute a 37°
I	5 giorni: raccolto dall'escisione di un sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	1 1 1	1 2 3	Fini ammassi granulari in mezzo ai quali si notano come delle strie irregolari finissime serpiginose: compaiono presto dopo 8-10 ore e si mantengono inalterate fino alla fine della osservazione che dura 24 ore.
II	8 giorni: raccolto dall'escisione di un sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	1 1 1	1 2 5	Idem.
III	6 giorni: raccolto dall'escisione di un sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	1 1 1	1 2 5	Idem.
IV	2 giorni; raccolto dall'escisione di un sifiloma ulcerato del solco balano prepuziale	1 1 1	1 2 5	Idem.
V	2 giorni: raccolto dall'escisione di un sifiloma integro del solco balano prepuziale	1 1 1	1 2 5	Idem.
VI	Siero come al caso I. . . . . Id. II. . . . . Id. III. . . . . Id. IV. . . . . Id. V.	— — — — —	— — — — —	Qualche ammasso granulare di origine leucocitaria, ma nessuna stria in essi.
VII	Siero dell'animale trattato. . .	—	—	Nulla che fermi l'attenzione salvo qualche granulino rifrangente, danzante.

Noi non possiamo precisare quale sia il valore di queste osservazioni, e in particolare delle strie che attirarono in modo particolare la nostra attenzione; notiamo solo che nelle prove sierodiagnostiche sui filtrati di sangue sifilitico un reperto simile è venuto a mancare.

Non credemmo però necessario spingerci più oltre in queste indagini che cominciavano già a uscire dal piano del nostro lavoro, convinti anche che esse avrebbero trovato posto più adatto in un altro che o noi od altri avrebbe potuto iniziare. Tanto meno poi ci parve il caso di portare la questione nella pratica per adire a ricerche diagnostiche dell'infezione sifilitica per mezzo di queste nuove prove, come a tutta prima pareva dovessimo finire coll'arrivare.

VIII.

Conclusioni.

Dai fatti esposti nel presente lavoro, ecco le conclusioni principali che noi crediamo possano trarsene.

I. I sifilomi ulcerati ed integri, escisi, ed opportunamente triturati e diluiti con glicerina e Na Cl al 0.85 %, filtrati attraverso le candele Berkefeld comuni, le V, le N, le W e anche altre candele che trattengono i comuni batteri, lasciano passare un liquido, che inoculato sulla cute dell'uomo e degli animali di laboratorio, sottocute nelle vene e nel peritoneo di questi ultimi, nei glutei dell'uomo, si mostra sfornito di qualsiasi azione locale e generale, e nello stesso modo si diportano i filtrati di manifestazioni sifilitiche ottenuti attraverso le Berkefeld V ed N da materiali raccolti in altri periodi dell'infezione: *nessuno di essi riproduce l'infezione sifilitica.*

II. I filtrati di manifestazioni sifilitiche primarie ulcerate riducono il liquido indicato dal Neisser e Wechsberg per la prova bioscopica; quelli di manifestazioni primarie integre e quelli di manifestazioni secondarie e terziarie non lo riducono: *la prova bioscopica quindi non mette in evidenza nei filtrati alcunchè di specifico.*

III. Gli innesti endocorneali dei filtrati di manifestazioni sifilitiche e dei sieri dei sifilitici, quelli delle mescolanze dei sieri di sifilitici e degli animali trattati coi filtrati, quelli del contenuto dei sacchetti di collodion in cui vennero innestati i filtrati, ecc., non hanno determinato la produzione di alcun *cythoryctes* nelle cellule dell'epitelio corneale.

IV. Le prove sierodiagnostiche, facendo agire sui filtrati, il siero di animali trattati e il siero di sifilitici non hanno prodotto alcun precipitato specifico; innestando i filtrati in brodo nei sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli, il liquido rimane sterile e nulla vi si produce aggiungendovi gli stessi sieri specifici: le prove sierodiagnostiche, fatte con gli stessi sieri sul filtrato del sangue dei sifilitici triturato e filtrato o semplicemente diluito e filtrato, hanno condotto ad analoghi risultati.

V. Le prove sierodiagnostiche, facendo agire sul siero dei sifilitici non filtrato, il siero degli animali trattati, hanno messo in evidenza un reperto microscopico che non può essere ancora ben interpretato e che manca nelle mescolanze di siero filtrato e di siero degli animali trattati.

***

Possiamo dunque ritenere che ***i filtrati di manifestazioni sifilitiche ottenuti attraverso le candele Berkefeld comuni, N, V, W ed altre candele, non contengono l'agente etiologico dell'infezione sifilitica. E perciò resta assodato con la prova sull'uomo, avvalorata da quella bioscopica, dalle prove sierodiagnostiche col siero di animali immunizzati, e con quello dei sifilitici, e cogli innesti endocorneali, che l'agente dell'infezione non si trova nelle manifestazioni sifilitiche in uno stadio da farlo rientrare nella categoria dei germi invisibili od ultramicroscopici.***

***

Nel rivedere le bozze del nostro lavoro aggiungiamo che secondo Siebert, nell'Istituto del Klingmüller, filtrando il succo di manifestazioni sifilitiche primarie attraverso candele, non passano forme di spirochete (*D. Med. Wochenscrift*, 12 ottobre 1905).

Istituto d'Igiene
della R. Università di Cagliari

Istituto Dermosifilopatico
della R. Università di Catania

Tentativi di profilassi e terapia antisifilitica coi filtrati amicrobici di manifestazioni sifilitiche e con siero di cane trattato con i filtrati stessi.

Ricerche dei professori **O. CASAGRANDI** e **R. DE LUCA.**

Uno di noi aveva di già osservato che il filtrato amicrobico del vaccino, inoculato sulla cute dei cani, poteva immunizzarli. Questo fenomeno, ripetendosi con costanza, gli aveva fatto collocare un simile procedimento d'immunizzazione fra quelli indicati per mettere in evidenza germi invisibili nei filtrati, affermando che « quando col filtrato non si riesce ad « ottenere alcuna lesione che caratterizzi « la malattia, rimane sempre da vedere, se l'animale non sia rimasto « immunizzato. »

L'altro di noi, prendendo in esame i poco felici risultati dei tentativi di siero-terapia antisifilitica, fatti fino ad ora, proponeva di eseguirne alcuni per mezzo dei filtrati amicrobici di manifestazioni sifilitiche, ritenendo che si sarebbe considerato l'argomento da un punto di vista non ancora toccato da alcuno.

Intanto i fatti che già prima dell'agosto 1904 erano a nostra cognizione e che si ricavavano da esperimenti di altri e nostri, intorno alla non contagiosità dei filtrati di manifestazioni sifilitiche, se ci permettevano di ammettere che in essi non si trovava l'agente patogeno della sifilide, non ci davano criteri per ammettere o negare *a priori*

se tali filtrati fossero dotati o no di virtù immunizzante di fronte alla infezione sifilitica nell'uomo. E per fornire tale prova, ci accingemmo alle ricerche che formano l'obbietto del presente lavoro (1).

***

Considerando l'esperimento di profilassi nelle sue linee generali, si presentava a prima vista irto di difficoltà, tali da sembrare insormontabili. Ma con tutto ciò ci decidemmo a intraprendere lo studio della questione, tanto più che uno di noi, trovandosi in mezzo ad un vasto campo di osservazione clinica, avea modo di scegliere per gli esperimenti, i soggetti più adatti, senza venir meno alle leggi dell'umanità e del rispetto altrui; d'altronde i nostri tentativi erano tali, che qualunque più rigida coscienza, avrebbe approvato, trattandosi di esperimenti intesi a creare delle pratiche di profilassi contro la più popolare delle malattie d'infezione.

Naturalmente per lo scopo del lavoro, il vedere se i filtrati di manifestazioni sifilitiche, che noi già conoscevamo con sicurezza essere sprovveduti di contagiosità, avessero immediate virtù immunizzanti nell'uomo, non era bastevole, perchè urgeva anche di conoscere per quanto tempo la eventuale immunità durasse. Per ottenere tale nozione, si sarebbe però resa necessaria la inoculazione e reinoculazione sperimentale nell'uomo di sostanza virulenta sifilitica; sicchè allora l'esperimento clinico si sarebbe presentato in veste di esperimento da laboratorio. Essendo tale prova inammissibile, ci fu giuocoforza attenerci alla prova clinica, la quale, per altro, nei risultati pratici del caso nostro, non era da ritenersi meno probante dell'esperimento, atteso il modo nel quale noi ci proponevamo di condurla.

Un punto importante da sormontare nelle nostre ricerche, era quello di potere accertare con sicurezza la data del contatto contagiante, per poter desumere eventualmente la durata massima e minima della immunità, nel caso si fosse ottenuta; tale necessità ci imponeva una sorveglianza quotidiana, quasi poliziesca dei profi-

---

(1) Lavoro in collaborazione e condotto secondo un piano tracciato di comune accordo fra i due Autori.

Il Casagrandi si assunse la preparazione del materiale in modo da renderlo filtrabile e inoculabile, quindi la preparazione dei filtrati e del siero di cane con le necessarie prove atte a giudicare della loro sterilità, non che le prove siero-diagnostiche, delle quali si parla in fine del lavoro.

Il De-Luca, che fornì il materiale di studio, si incaricò di tutti gli espesimenti clinici, cioè del trattamento profilattico e curativo per mezzo dei filtrati e del siero di cane trattato, già preparati dal Casagrandi.

lassati, dei quali, benchè collaboratori volontari e coscienti, molti si ecclissarono nel corso dello esperimento facendolo andare perduto; ed è così che di 13 prove di profilassi, 6 sole furono condotte al punto da poterne tirare qualche conseguenza.

Scevro di qualunque difficoltà e quindi facile ad essere considerato anticipatamente in tutti i suoi particolari, si presentava invece lo studio del potere curativo dei filtrati. Alcune inoculazioni precedenti fatte nei sifilitici, in confronto a quelle eseguite nei sani, riferite in altro lavoro, ci avevano già assicurato della innocuità del materiale ed anche, in qualche caso, della sua nulla azione curativa. Con tutto ciò, noi credemmo utile praticare delle ricerche sistematiche con i vari filtrati e su diversi sifilitici in istadi diversi, prima di emettere un qualsiasi giudizio definitivo, favorevole o no a questo metodo di cura. Credemmo inoltre necessario, per completare lo studio dell'argomento, di procedere a tentativi di cura antisifilitica con siero di cane trattato coi filtrati stessi.

Ecco, come siamo ora in grado di presentare, coll'attuale lavoro, alcuni tentativi di profilassi e di terapia antisifilitica coi filtrati di manifestazioni specifiche in tutti gli stadî ed altri di sieroterapia coi filtrati stessi, i quali tentativi, i primi senza dubbio, completano nel senso enunciato da uno di noi, le ricerche esposte in altro lavoro sul passaggio o non del virus sifilitico nei filtrati stessi.

I.

Tecnica per la preparazione dei filtrati.

Riguardo alla tecnica per ridurre filtrabile il materiale sifilitico, abbiamo seguito quegli stessi procedimenti già esposti nell'altro lavoro per giudicare dell'attività del filtrato ottenuto attraverso candele Berkefeld ed altre.

Esciso il materiale per biopsia, l'abbiamo triturato insieme a quarzo chimicamente puro, prima in mortaio di porcellana e poi di agata, aggiungendovi qualche goccia di glicerina neutra, per facilitarne la triturazione. Quindi abbiamo diluita la poltiglia nelle proporzioni approssimative di 1 di materiale in 30 di glicerina diluita con NaCl al 0,85 % (1 parte di glicerina e 25 di NaCl al 0,85 %); poi l'abbiamo filtrata attraverso comuni candele Berkefeld.

Queste candele erano state precedentemente scelte fra quelle che poste in un recipiente con acqua e raccordate a una pera a pressione, non lasciavano fuoriuscire bollicine di aria. Esse erano state sterilizzate nell'autoclave a 110° e adattate ad un apparecchio che permetteva di poter ricavare il liquido filtrato volta a volta, in quella quantità che abbiso-

gnava, senza travasarlo e senza che quello che restava nel recipiente venisse in contatto dell'aria. Ci si servì allo scopo di provette di vetro robusto con una tubulatura laterale in cui era intercalata una dilatazione che si riempiva di cotone; il fondo del recipiente era tirato ad imbuto, in modo da potervisi adattare un tubetto di gomma, stringibile da una pinza, all'esterno del quale tubetto se ne innestava un altro, ma però di vetro tirato a pizzetta. Questo si introduceva entro una comune provetta, che si obbligava a rimanere ad esso attaccata per mezzo di un batuffolo di cotone attraversato dal tubetto stesso. L'orifizio del recipiente era chiuso con un tappo di gomma ad un foro, nel quale si introduceva un tubo di vetro, che al di fuori era piegato a doppia squadra; alla branca verticale, parallela a quella infissa nel tappo era innestato un tubo di gomma molto resistente mentre nell'estremo libero di questo tubetto di gomma si introduceva il collo del cappuccio della candela. Il liquido da filtrare si versava in un piccolo recipiente cilindrico, entro a cui si introduceva la candela, badando di non immergerla fino al cappuccio, e lo si faceva, usando prima la precauzione di coprire l'attacco con mastice Archanson.

Il liquido era costretto a passare attraverso la candela, raccordando la tubolatura laterale del recipientino, con il tubo della pompa per il vuoto. Naturalmente, dopo sterilizzate le candele e il recipiente di vetro col tappo di gomma e il tubo pure di gomma annesso a quello di vetro piegato a doppià squadra, si montava tutto l'apparecchio e lo si sterilizzava ancora una volta.

Il liquido filtrato, raccolto nel recipiente a tubulatura laterale, non veniva travasato, ma vi si lasciava, sospendendo il recipientino ad un sostegno per mezzo di una morsetta, sostituendo rapidamente il tappo di gomma con l'annessa candela con un altro di cotone sterilizzato, e ciò si faceva per poter togliere anche la candela, che così bagnata del materiale e vicina al recipientino, nei maneggi successivi, per prelevare del liquido, poteva eventualmente inquinarlo.

Quando poi si doveva fare un'injezione, si apriva la morsetta che stringeva il tubettino di gomma della pizzetta e si lasciava cadere quel numero di gocce o di cmc. che si voleva nella sottostante provetta. Quindi, appena tolta quest'ultima, se ne sostituiva un'altra già sterilizzata, pronta, lasciando a posto il battuffolo di ovatta attorno alla pizzetta. Naturalmente qualche goccia di ciascun filtrato fu sempre innestata nei becchi di clarino di agar, e salvo i casi in cui si dovette subito inocularlo, si aspettò sempre qualche giorno, prima di farlo, onde assicurarsi della sua amicrobicità. In ogni caso, quando lo si inoculò prima di attendere il responso colturale, lo si esaminò microscopicamente e al menomo dubbio, non si usò. Teniamo a far notare, che sotto questo riguardo, siamo stati sempre scrupolosissimi; del resto, solo due volte abbiamo trovato il filtrato inquinato e numerose sono state le filtrazioni, tanto più che lo stesso materiale veniva spesso diviso in due o tre recipienti e filtrato contemporaneamente, attraverso 3-4-5 candele; il dispositivo all'uopo annesso alla pompa di aspirazione permetteva anche di poter fare 8 filtrazioni simultanee.

Durante la filtrazione, si provò dapprincipio se le candele permettevano il passaggio del *b. prodigioso*, versando nei vasetti in cui erano immerse le candele, delle emulsioni nella identica miscela glicero-acquosa di

patine del batterio raschiate da becchi di clarino di agar, innestando poi il filtrato in altri becchi di clarino d'agar.

Qualche volta trovammo che il germe era passato, ma si trattò di casi in cui la filtrazione era durata più di un'ora. Comunque, nelle ulteriori ricerche, se i filtrati dovevano essere inoculati in animali, si tralasciò questa prova, la quale per lo scopo a cui doveva servire il filtrato, era superflua: bastava infatti il responso colturale degli innesti del filtrato, fatto sull'agar per giudicare della sua sterilità.

Naturalmente i recipienti coi filtrati, sospesi o no, ai sostegni, erano tenuti all'oscuro e a temperatura bassa, per il tempo che occorreva servirsene. Se questo si presumeva dovesse essere di molti giorni, prima dell'ultima sterilizzazione, si versava nel recipiente una quantità di glicerina pura neutra e poi si interrompeva la filtrazione, quando il liquido filtrato era passato in quantità doppia o tripla del liquido glicerico. Questo si faceva allo scopo di avere un filtrato con molta glicerina, e quindi più facilmente, per ogni evenienza, conservabile in condizioni di amicrobicità.

II.

Prove di profilassi e di terapia antisifilitica con i filtrati di manifestazioni specifiche (1).

α. *Tentativi di profilassi.*

Osservazione I. — *Sifiloma* primario esciso il 23 luglio e conservato in glicerina fino al dì 8 agosto, in cui fu triturato, diluito e filtrato attraverso una Berkefeld comune: all'esame colturale il filtrato si dimostra amicrobico.

Il 15 agosto, cioè trascorsi 23 giorni dall'escisione, si comincia a iniettare il filtrato, a scopo preventivo, nei glutei di un giovinotto benestante, uso a correre la cavallina, il quale si sottomette volontariamente alla prova.

Ecco il diario delle inoculazioni fatte:

15	agosto 1904	inoculazione di cmc.	0.50	
17	Id.	id.	0.75	
19	Id.	id.	1.00	
21	Id.	id.	1.00	In tutto cmc. 10 di filtrato in 16 giorni, senza che il soggetto risenta alcuna conseguenza nè generale nè locale.
22	Id.	id.	1.00	
23	27	id.	1.25	
27	Id.	id.	1.50	
29	Id.	id.	1.50	
30	Id.	id.	1.50	

(1) Notiamo che non sono comprese nel lavoro se non le prove riuscite complete o quasi. Delle altre non teniamo conto per non ingombrare il lavoro con esperimenti dai quali, dal punto di vista della profilassi, non poteva dedursi alcuna conclusione.

Si cessa il trattamento, perchè il soggetto il 30 agosto ebbe due contatti con una donna affetta da papule umide ai genitali, contatto che rinnovò certamente il 17 e il 23 settembre successivo con donne molto sospette.

Il 17 novembre, cioè 79 giorni dopo i primi due contatti, 61 dopo il terzo e 55 dopo il quarto, si nota nel di lui prepuzio (foglietto mucoso) una piccola papula che al 5° giorno comincia ad erodersi, che al 10° si allarga; in questo stesso giorno si comincia ad apprezzare un ingorgo delle glandole linfatiche inguinali di ambedue i lati, che in breve si fa più manifesto a destra; al 18° giorno la lesione del prepuzio si è già trasformata ed ha assunto i caratteri tipici del sifiloma primario, cioè: larga papula erosa, poco secernente, a base indurita, con bubboni satelliti tipici, più sviluppati a destra. Tale lesione fu seguita da manifestazioni tipiche di sifilide costituzionale, dopo un normale periodo di seconda incubazione.

Osservazione II. — *Sifiloma* primario ulcerato esciso il 7 settembre 1904, conservato in glicerina fino al 20 dello stesso mese, giorno in cui fu triturato, diluito e fatto passare attraverso una Berkefeld comune; si ottiene un filtrato, che all'esame colturale si dimostra amicrobico. Il 26 settembre successivo se ne principia la inoculazione nei glutei ad uno studente di anni 21, certamente indenne di sifilide, che volontariamente si sottomise:

Il diario di tali inoculazioni è il seguente:

26	settembre 1904	inoculaz. di cmc.	1.00	In tutto 11 injezioni di complessivamente 11 cmc. di filtrato in 12 giorni, injezioni che riescono tutte assai bene tollerate.
27	Id.	id.	1.00	
28	Id.	id.	1.00	
29	Id.	id.	1.00	
30	Id.	id.	1.00	
2	ottobre 1904	id.	1.00	
3	Id.	id.	1.00	
4	Id.	id.	1.00	
5	Id.	id.	1.00	
6	Id.	id.	1.00	
7	Id.	id.	1.00	

Il soggetto la sera del 10 ottobre, cioè tre giorni dopo finito il trattamento, ha un contatto sessuale con donna certamente contagiante (papule umide ai genitali); ne ha qualche altro semplicemente sospetto negli 8 giorni successivi; è da noi visitato quasi quotidianamente fino al 9 decembre, cioè 60 giorni dal coito certamente contagioso avvenuto il 10 ottobre, e fu trovato sempre sano.

Dal 9 decembre fu perduto di vista.

Osservazione III. — *Sifiloma* superficialmente ulcerato, esciso, triturato, diluito e filtrato il 17 ottobre 1904; lo stesso giorno in cui si ottiene il filtrato si principia l'inoculazione nei glutei di un barbiere di 24 anni, indenne di sifilide, che si sottopose spontaneamente al trattamento. Il filtrato all'esame colturale, si rivela amicrobico.

Le singole inoculazioni hanno le seguenti date:

17	ottobre 1904	inoculazione di cmc.	1.00	Si injettano complessivamente 12 cmc. di filtrato in 14 giorni. Non si ha reazione nè generale nè locale.
18	Id.	id.	1.00	
19	Id.	id.	1.00	
20	Id.	id.	1.00	
21	Id.	id.	1.00	
22	Id.	id.	1.00	
23	Id.	id.	1.00	
24	Id.	id.	1.00	
26	Id.	id.	1.00	
27	Id.	id.	1.00	
29	Id.	id.	1.00	
30	Id.	id.	1.00	

Si sa con sicurezza che la sera del 5 novembre, il soggetto ebbe due contatti sessuali con la medesima donna, nelle più favorevoli condizioni per contagiarsi (la donna era affetta da papule umide ai genitali e roseola incipiente). Fu visitato due volte per settimana fino al 29 dicembre, e fu trovato sempre sano.

Dopo tale data, cioè dopo 54 giorni dai contatti contagianti, il soggetto fu perduto di vista.

Osservazione IV. — *Sifiloma* ulcerato esciso il 21 ottobre 1904; si conserva in glicerina per un giorno; l'indomani, 22, si tritura, si diluisce, si filtra attraverso a una comune Berkefeld e si ottiene un filtrato, che all'esame colturale, si presenta amicrobico.

Con tale filtrato, il 26 ottobre successivo, si principia il trattamento in un giovane fontaniere, il quale si era presentato due giorni prima ad uno di noi, chiedendo la visita di una donna che conduceva con sè, e che risultò affetta da sifiloma primario ed edema duro del pudendo maggiore sinistro. Era una donna che egli aveva rapito l'istesso giorno, e che ad onta fosse stato edotto da noi sulle gravi conseguenze a cui si esponeva tenendola, non volle cavallerescamente abbandonare; solo accondiscese che fosse curata in clinica, e lui stesso si sottomise volontariamente al trattamento profilattico.

Ed ecco il diario di tale trattamento:

26	ottobre 1904	inoculazione di cmc.	1.00	Complessivamente 12 injezioni da 1 cmc. l'una di filtrato in 14 giorni; tollerate al solito senza reazioni nè generali nè locali.
27	Id.	id.	1.00	
28	Id.	id.	1.00	
29	Id.	id.	1.00	
30	Id.	id.	1.00	
31	Id.	id.	1.00	
2	novembre 1904	id.	1.00	
4	Id.	id.	1·00	
5	Id.	id.	1.00	
6	Id.	id.	1.00	
7	Id.	id.	1.00	
8	Id.	id.	1.00	

Dopo il giorno 8 novembre, si sospende il trattamento, perchè ritenuto sufficiente.

Il 10 dello stesso mese, la donna già migliorata, ma ancora in periodo contagioso, esce dalla clinica a sua viva richiesta e, munita di tutte le istruzioni per continuare la cura, va a coabitare col suo fontaniere.

Il quale il 26 gennaio 1905, cioè 77 giorni dal 10 novembre 1904, giorno in cui la donna era uscita dall'ospedale, si ripresenta a noi, perchè affetto da lesione al solco balano-prepuziale, lato destro, che è diagnosticata come sifiloma primario. Narra che tale lesione, a cui si ostina di non dare importanza, data da una quindicina di giorni. Ci informa anche, che sin dal giorno in cui prese la donna in casa, ebbe con lei dei rapporti frequentissimi, per la prima settimana munito di *condom* e poi senza.

Una roseola al tronco, venuta in iscena in aprile, pose fine al dubbio in cui fin allora si era ostinato il soggetto.

Osservazione V. — *Papule mucose ipertrofiche* conferte dei pudendi maggiori e minori di una contadina mai trattata; l'infezione sifilitica data da 5 mesi.

Il 7 ottobre 1904, di dette papule se ne escide un tratto di circa cmc. 2 ½ si tritura, si diluisce e si filtra attraverso una comune Berkefeld: si ottiene un filtrato, che all'esame colturale si dimostra amicrobico. Dopo 4 giorni dall'escisione fatta, il dì 11 ottobre, si principia a inoculare il filtrato nei glutei di un calzolaio di anni 21, che all'esame fisico non presenta tracce di lue, nè in atto, nè pregressa, nè acquisita, nè ereditaria e che da circa due mesi, soffrendo di epididimite, non avvicina donne.

Ecco il diario:

11	ottobre 1904	inoculazione di cmc.	1.00	In tutto cmc. 9 di filtrato di manifestazione secondaria, injettato in 9 giorni. Il trattamento, al solito, fu tollerato benissimo.
12	Id.	id.	1.00	
13	Id.	id.	1.00	
14	Id.	id.	1.00	
15	Id.	id.	1.00	
16	Id.	id.	1.00	
17	Id.	id.	1.00	
18	Id.	id.	1.00	
19	Id.	id.	1.00	

Dopo 6 giorni dell'ultima iniezione, cioè il 25 ottobre, essendo già guarito dell'epididimite, il soggetto, nello spazio di qualche ora, ha due contatti con donna affetta da papule ulcerate ai genitali ed all'ano. Da tali contatti, fino al giorno 18 dicembre, cioè dopo 54 giorni, non si erano avute conseguenze visibili.

Dopo tale giorno il soggetto fu perduto di vista.

Osservazione VI. — Larga infiltrazione sifilomatosa, sormontata da noduli vegetanti, conferti, sita nella piega genito-crurale di giovane sifilitica, infetta da 5 anni e da uno di noi già molte volte curata, sin dall'inizio dell'infezione.

Il giorno 11 agosto si escide un frammento di detta infiltrazione vege-

tante, di circa 3 cmc., si tritura, si diluisce, si filtra attraverso una Berkefeld; si innesta il filtrato, su agar a becco di clarino, con risultato negativo.

Il 28 agosto, cioè 17 giorni dall'escisione, si principia il trattamento in un individuo di anni 22, indenne di infezione sifilitica, che volontariamente si sottometteva a un trattamento preventivo contro l'infezione sifilitica.

Ecco il diario del trattamento:

28 agosto 1904	inoculazione di cmc.	1.00		
29	Id.	id.	1.00	
31	Id.	id.	1.00	
1 settembre 1904		id.	1.00	Si inoculano complessivamente 11 cmc. di filtrato di manifestazione terziaria in 14 giorni. Le inoculazioni, al solito, sono benissimo tollerate.
2	Id.	id.	1.00	
3	Id.	id.	1.00	
5	Id.	id.	1.00	
6	Id.	id.	1.00	
7	Id.	id.	1.00	
8	Id.	id.	1.00	
10	Id.	id.	1.00	

Dopo il 10 settembre si sospende il trattamento; il 13 dello stesso mese il soggetto ha un contatto sessuale con donna affetta da grosso sifiloma primario al grande labbro destro. Altro contatto sessuale, anch'esso con donna contagiosa (papule umide vulvari) il soggetto ha il 21 dello stesso mese.

E' visitato una volta per settimana fino al giorno 3 di novembre, cioè 51 giorni dopo il primo contatto sessuale ed è trovato sempre sano. Da quel giorno fu perduto di vista.

β. *Tentativi di terapia* (1).

Osservazione VII. — Per questa prova si adopera il materiale impiegato nell'esperimento di profilassi n. III e dopo, esaurito questo, il materiale dell'esperimento n. IV.

Ricordiamo che il primo era stato ricavato da un sifiloma esciso e filtrato il 17 ottobre 1904; il 2° da un sifiloma esciso il 21 e filtrato il 22 ottobre stesso.

Si principia il trattamento il 23 dello stesso mese in un sifilitico affetto da sifiloderma acneico generalizzato, col seguente diario:

(1) Ne riportiamo soltanto tre prove, facendo però rilevare, che, oltre di esse, ne abbiamo fatto altre con filtrati di sifilomi primari, a cominciare dallo stesso giorno in cui il filtrato fu ricavato. Ci dispensiamo dal riportarli, avendo ottenuto risultati negativi.

23	ottobre 1904	inoculazione di cmc.	1. 00	Si impiegano ben 15 cmc. di filtrato di due sifilomi primarii, in 18 giorni di trattamento, durante il quale non si notano fatti riferibili a questo.
24	Id.	id.	1. 00	
25	Id.	id.	1. 00	
26	Id.	id.	1. 00	
27	Id.	id.	1. 00	
28	Id.	id.	1. 00	
29	Id.	id.	1. 00	
1	novembre 1904	id.	1. 00	
2	Id.	id.	1. 00	
4	Id.	id.	1 ·00	
5	Id.	id.	1. 00	
7	Id,	id.	1. 00	
8	Id.	id.	1. 00	
9	Id.	id.	1. 00	
10	Id.	id.	1. 00	

Il sifiloderma non subisce veruna modificazione apprezzabile.
Il tentativo è giudicato fallito e perciò abbandonato.

Osservazione VIII. — Per questa prova si adopera lo stesso materiale dell'osservazione V, cioè filtrato di papule mucose ipertrofiche escise il 7 ottobre 1904.

Si principia la prova di terapia, e si continua fino al 12 novembre, in un individuo di anni 28 affetto da sifiloderma papulo-squamoso diffuso sul tronco e sugli arti.

Il trattamento fu fatto col seguente diario:

25	ottobre 1904	inoculazione di cmc.	1. 00	15 injezioni con l'impiego di 16 cmc. di filtrato complessivamente in 19 giorni di trattamento. Nessun disturbo dipendente da questo.
26	Id.	id.	1. 00	
27	Id.	id.	1. 00	
28	Id.	id.	1. 00	
30	Id.	id.	1. 00	
1	novembre 1904	id.	1. 00	
2	Id.	id.	1. 00	
3	Id.	id.	1. 00	
5	Id.	id.	1. 00	
6	Id.	id.	1. 00	
7	Id.	id.	1. 00	
8	Id.	id.	1. 00	
9	Id.	id.	1. 00	
10	Id.	id.	1. 50	
12	Id.	id.	1. 50	

Verso il 7 novembre si nota un certo grado di iniezione pericheratica all'occhio sinistro, che aumenta e verso il 10 si accompagna con leggera decolorazione e paresi dell'iride. I fatti di iridite facendosi di ora in ora più manifesti, si sospende il trattamento di prova e si dà subito mano alle iniezioni mercuriali.

La prova fu giudicata fallita.

Osservazione IX. — Anche allo scopo di completare le prove, volemmo tentare l'uso terapico del filtrato di manifestazioni terziarie, oltre quello di manifestazioni primarie e secondarie.

All'uopo ci servimmo dello stesso filtrato dell'osservazione VI tratto da una manifestazione tardiva. E l'impiegammo in un giovane sifilitico di anni 22 affetto da roseola del tronco e da un sifiloma al glande ancora in via di risoluzione. Si principia il trattamento il 15 novembre 1904, e si continua col seguente diario:

15	novembre 1904	inoculazione di cmc.	1.00	In tutto cmc. 14, somministrati per injezioni nei glutei in 14 giorni. Le injezioni non produssero fatti reattivi nè locali nè generali.
16	Id.	id.	1.00	
17	Id.	id.	1.00	
18	Id.	id.	1.00	
19	Id.	id.	1.00	
20	Id.	id.	1.00	
21	Id.	id.	1.00	
22	Id.	id.	1.00	
23	Id.	id.	1.00	
24	Id.	id.	1.00	
25	Id.	id.	1.00	
26	Id.	id.	1.00	
27	Id.	id,	1.00	
28	Id.	id.	1.00	

L'andamento dell'infezione non sembra subire apprezzabile influenza dal trattamento; anzi durante la prova la roseola si estende agli arti, dove non era prima della cura.

Anche questo tentativo, dunque, si considera fallito.

***

Dalla esposizione fatta fin qui risulta, che abbiamo fatto complessivamente 9 prove, delle quali 6 a scopo profilattico e 3 a scopo curativo.

Di queste, 4 sono state fatte con filtrato di sifilomi primari, 1 con filtrato di manifestazioni secondarie ed 1 con filtrato di manifestazioni terziarie.

Nella prima osservazione abbiamo che, il soggetto, appena finito il trattamento, ha due contatti sessuali, certamente contagiosi (30 agosto) che ne ha un terzo, il 17, ed un quarto il 23 settembre e queste due volte con donne molto sospette.

Abbiamo inoltre che il 17 novembre successivo (rispettivamente 79, 61 e 55 giorni dalle date di detti contatti), il soggetto presenta i primi fatti di infezione. Ora, secondo noi, in questa prima osservazione, il contatto sessuale contagiante verisimilmente dovette essere

quello che ebbe un periodo di prima incubazione della durata che più si avvicina alla norma, cioè quello del 23 settembre, o forse anche qualche altro coito posteriore di cui noi non abbiamo notizia. Avrebbe potuto essere anche quello del 17 novembre; riteniamo però si possa escludere che fosse stato uno dei due contatti del 30 agosto.

Dal che ne consegue, che, in questa prima prova, si sarebbe ottenuta una immunità, che dal 30 agosto andrebbe al 23 o anche al 17 settembre, cioè una immunità che avrebbe avuto una durata dai 17 ai 23 giorni.

Nella seconda osservazione il soggetto ha un contatto sessuale certamente contagioso il 10 ottobre, cioè 3 giorni dopo che fu finito il trattamento; ne ha poi nei successivi 8 giorni altri due assai sospetti, ma il soggetto fu perfettamente sano sino al 60° giorno in cui fu da noi visitato per l'ultima volta. Anche, ammettendo che l'individuo appena sottrattosi alla nostra osservazione si fosse mostrato contagiato, si potrebbe sempre ammettere di avere ottenuta una immunità che si sarebbe aggirata attorno ai 20 giorni, tenendo calcolo del normale periodo di incubazione dell'infezione e sottraendolo dai 60 giorni durante i quali noi potemmo osservarlo.

Nella terza osservazione 6 giorni dopo il trattamento (durato fino al 30 ottobre) il soggetto ha due contatti sessuali certamente contagiosi (donna affetta da papule umide vulvari), ma fino al 29 dicembre, ultimo giorno in cui fu visitato (54 giorni dal contatto contagioso) il soggetto non presenta nessun segno d'infezione. Anche in questa terza prova ripetendo le stesse considerazioni fatte per la seconda si potrebbe ammettere di aver ottenuta una immunità, che, come nella seconda, si aggirerebbe sui venti giorni circa.

Nella quarta osservazione due giorni dopo il trattamento, ovvero 10 giorni dopo di esso (18 novembre) se si vuol tener calcolo della settimana in cui asserisce di avere usato il *preservativo*, il soggetto ha dei contatti quotidiani, e a lungo durati con donna sicuramente contagiosa (sifiloma primario ai pudendi). Rivisitato il 26 gennaio si trova affetto da sifiloma primario, nato da una quindicina di giorni, al solco balano-prepuziale dal lato destro. Certamente tale sifiloma nato nella prima settimana di gennaio non si può mettere a calcolo dei contatti contagiosi avuti dal soggetto nel mese di novembre. È più consono infatti alle abitudini normali dell'infezione sifilitica avere un periodo di prima incubazione dai 30 ai 40 giorni, ciò che nel caso nostro importerebbe che il coito contagiante sarebbe avvenuto dal 1° al 15 dicembre.

Se così è, bisogna dedurre che anche in questa 4ª osservazione si sarebbe ottenuta una immunità, durata una ventina di giorni.

Nella quinta osservazione abbiamo un contatto certamente contagioso avvenuto 6 giorni (23 ottobre) dal termine del trattamento (19 dello stesso mese).

Fino al 18 dicembre, cioè fino a 54 giorni dopo tale data, il soggetto, da noi visitato per l'ultima volta, non presentava fenomeni di infezione; così è da dedurre che anche in questa 5ª osservazione si sarebbe ottenuta una immunità della durata da 16 giorni in più.

La stessa immunità breve si può ammettere nella 6ª osservazione, in cui il soggetto, 51 giorni dopo un contatto sessuale, certamente contagioso, fino a quando fu sorvegliato, non presentava traccie di infezione sifilitica.

Ricapitolando adunque, abbiamo eseguito 6 trattamenti preventivi con filtrati di manifestazioni sifilitiche in ogni stadio, dopo i quali, tutti e 6 i soggetti sottomessi alla prova, in un primo contatto contagioso, avvenuto subito dopo o a poca distanza dal trattamento, sfuggirono al contagio.

Da questo dato di fatto, si sarebbe condotti ad ammettere che: *il filtrato di manifestazioni sifilitiche, sia primarie che secondarie o terziarie, se inoculato nell'uomo, indenne di sifilide, determinerebbe un'immunità verso la infezione sifilitica, immediata al trattamento.*

E siccome, nei due casi di contagio constatati da noi, questo sarebbe avvenuto nei contatti sessuali successivi al primo, e non prima di una ventina di giorni dal termine del trattamento; e inoltre, siccome tale risultato non sarebbe contraddetto dalle altre quattro prove, dalle quali i soggetti, fino a che restarono sotto la nostra osservazione, non presentarono tracce d'infezione, così ci parrebbe di poter completare la detta conclusione, aggiungendo che: *nel trattamento con filtrati di manifestazioni sifilitiche, la durata dell'immunità sarebbe brevissima, perchè si aggirerebbe intorno ai 20 giorni.*

Alla conclusione che una immunità si provochi si viene ancora quando si consideri che, per negarla, bisognerebbe ammettere o una strana coincidenza di 6 contatti contagiosi praticati più o meno prossimamente al trattamento dei filtrati, rimasti tutti non contagianti, ovvero che, per una più strana coincidenza, in tutti e due i casi nei quali constatammo il tardivo contagio, e forse anche in tutte o in parte delle osservazioni in cui i soggetti furono perduti di vista, si fosse trattato d'infezione sifilitica a periodo di incubazione eccezionalmente lungo.

Stando così le cose, l'immunità contro un primo contatto sessuale contagioso, subito dopo il trattamento, nei nostri soggetti, si sarebbe ottenuta:

1° con filtrato di sifiloma primario dello stesso giorno;
2° con filtrato di sifiloma primario di 5 giorni;
3° con filtrato di sifiloma primario di 19 giorni;
4° con filtrato di sifiloma primario di 23 giorni;
si sarebbe ottenuta inoltre:
5° con filtrato di manifestazioni secondarie di 4 giorni;
6° con filtrato di manifestazioni terziarie di 17 giorni.

Quindi ne segue, che l'azione immunizzante dei filtrati, almeno nei limiti dei nostri esperimenti, sarebbe stata posseduta, tanto dai filtrati di manifestazioni di recente escise, quanto da quelle escise da molti giorni. Di più, quest'azione si sarebbe indifferentemente trovata nei filtrati di manifestazioni primarie, secondarie e terziarie.

Volendo ora spiegare il meccanismo di tale immunità, riusciva assai difficile conciliarlo colla presenza del virus nel filtrato; invece è più presumibile, che se azione avesse avuto il filtrato contenente virus, o si sarebbe ottenuta una immunità non così breve, come quella raggiunta, o si sarebbe determinata un'infezione sifilitica. E in questo caso non si sarebbe avuta una reinfezione a così breve scadenza. Ora ognuno sa che la sifilide, una volta contratta, non permette, a così breve scadenza, una reinfezione, ed è anche discutibile che questa possa avvenire ulteriormente come nei due casi osservati. D'altro canto è ben vero che il virus sifilitico può conservarsi nella glicerina, per cui l'azione immunizzante dei filtrati, di 1 giorno o di 23, si potrebbe spiegare con la presenza in essi del germe dell'infezione; però non vi ha neanche dubbio che se questa spiegazione potesse andare per i filtrati delle manifestazioni primarie e secondarie, non potrebbe o sarebbe assai dubbia per quelli delle terziarie, dacchè bisognerebbe ammettere senza alcuna riserva, la contagiosità delle manifestazioni terziarie, ciò che la clinica non può ammettere.

Noi quindi siamo d'avviso, che l'immunità transitoria indotta dalla inoculazione dei filtrati, sia indipendente dal germe della sifilide. Del resto Metschnikoff ha provato se i filtrati delle sierosità sifilitiche fossero immunizzanti nelle scimmie ed è venuto a risultati negativi. E per quanto possa obbiettarsi che il Metschnikoff fece le sue prove con i filtrati di sierosità non diluite in glicerina, è certo che quest'obbiezione cade, quando si ponga mente che egli ha fatto anche l'esperimento di controllo con ciò che rimaneva sul filtro. E questo esperimento, dimostra appunto che la sierosità si-

filitica, diluita, come ha fatto quest'A. non perde la sua contagiosità. Se mai, perciò, secondo noi, l'esperimento del Metschnikoff ci porta a credere che, se i nostri filtrati glicerici furono immunizzanti, ciò si deve, presumibilmente all'avere, per mezzo della glicerina, estratto dalle manifestazioni sifilitiche un materiale, che ha agito unicamente nel produrre una immunità transitoria.

***

Quanto alle prove terapeutiche coi filtrati di manifestazioni sifilitiche di tutti e tre gli stadi, ci hanno resi sicuri che i *filtrati stessi non hanno alcun potere curativo verso l'infezione sifilitica.*

III.

Prove terapeutiche col siero di cane immunizzato coi filtrati.

Di fronte intanto all'assoluta mancanza di azione terapeutica da parte dei filtrati delle manifestazioni sifilitiche, ci parve possibile adire a nuove ricerche in questo senso, per mezzo del siero di animali trattati coi filtrati stessi.

A tale uopo, il 9 maggio, cominciammo a inoculare un grosso cane col filtrato di sifiloma primario ed abbiamo proseguito le inoculazioni per altre 19 volte nel lasso di tempo di 50 giorni, crescendo dalla dose di 2 cmc. via via fino a 40: l'inoculazione si è sempre fatta nel tessuto sottocutaneo. Dopo 3 giorni dall'ultima inoculazione, l'animale è salassato ed il siero raccolto, secondo i dettami della tecnica, per evitare ogni inquinamento, è diviso in tante fiale da 5 a 10 cmc. ciascuna, che si sono successivamente usate, per curare due sifilitici.

Ecco intanto il diario delle inoculazioni fatte sul cane coi vari filtrati usati all'uopo.

9	marzo 1905	inoculati con cmc.	2. 00	di filtrato di sifiloma primario ottenuto dopo 8 giorni dall'escisione attraverso una Berkefeld N.
10	Id.	id.	2. 50	
13	Id.	id.	3. 00	
19	Id.	id.	3.50	
21	Id.	id.	4. 00	
27	Id.	id.	4. 50	
30	Id.	id.	5. 00	
2	aprile 1905	id.	10. 00	
5	Id.	id.	10. 00	
9	Id.	id.	10. 00	di filtrato di sifiloma primario ottenuto 29 giorni dopo l'escisione, attraverso una Berkefeld W.
11	Id.	id.	15. 00	
13	Id.	id.	15. 00	
15	Id.	id.	15. 00	
19	Id.	id.	15. 00	
21	Id.	id.	20. 00	

25 aprile 1905	inoculati con cmc.	25. 00		di filtrato di sifiloma primario ottenuto 34 giorni dopo l'escisione attraverso una Berkefeld V.
29 Id.	id.	30. 00		
1 maggio 1905	id.	35. 00		
7 Id.	id.	40. 00		

L'animale sopportò abbastanza bene le inoculazioni; anzi ci siamo convinti che qualunque fosse la quantità inoculata, non se ne risentiva minimamente, purchè la quantità di glicerina non eccedesse un certo limite.

Il 10 maggio il cane fu salassato, ed assicuratici con prove colturali che il siero era sterile, fu usato a scopo curativo nei seguenti individui:

Osservazione I. — 20 maggio 1905. Soggetto giovane che presenta un'eruzione pustolosa più confluente alla faccia (fronte, solco naso-genieo e solco mentoniero); presenta inoltre fortissima faringite con papule ulcerate ai pilastri anteriori e alle tonsille; un sifiloma primario ulcerato sul dorso della verga e tutte le glandole accessibili al tatto, tipicamente ingrossate, dure, indolenti, scivolanti sotto la pressione. Come fenomeni subbiettivi vi ha forte disfagia, dolori reumatoidi agli arti e grande prostrazione di forze. Vi ha inoltre febbre vespertina che oscilla dai 37°. 5 ai 38°. 8, e ciò dal giorno in cui comparve l'eruzione.

22 maggio, ore 9. Temperatura 36°.6. Si pratica la prima iniezione di cmc. 2 di siero alla regione toracica laterale destra. Ore 17. Temperatura 37°. 4. Il paziente non accusa sensazione di sorta sul punto d'innesto.

23 maggio, ore 9. Temperatura 37°. Seconda iniezione di 2 cmc. di siero alla regione toracica laterale sinistra. Ore 17. Temperatura 37°. 4. Nessun fatto riferibile alla iniezione.

24 maggio, ore 9. Temperatura 36°. 9. Il paziente ha riposato un po' meglio delle notti precedenti; nessuna reazione nei punti di innesto; terza iniezione di 2 cmc. di siero. Ore 17. Temperatura 37°. 1

25 maggio, ore 9. Temperatura 36°. 4. Lo stato generale si mantiene invariato; le pustole sembrano principiare a disseccarsi; quarta iniezione di 4 cmc. di siero. Ore 17. Temperatura 37°. 6.

26 maggio. Il punto dell'ultima iniezione è un po' dolente ed anche un po' tumido; quinta iniezione di cmc. 5 di siero al triangolo di Scarpa a destra. Ore 17. Temperatura 39°.

27 maggio, ore 9. Temperatura 37° 4. Il paziente non ha dormito nella notte per le sofferenze alla gola ed i dolori accresciuti. Si nota una leggera iniezione sottocongiuntivale all'occhio destro e nuove pustole alla faccia, al cuoio capelluto, alla nuca e al tronco; sesta iniezione di 5 cmc. di siero. Ore 17. Temperatura 38°. 5.

28 maggio, ore 9. Temperatura 36°. 4. L'infermo ha passato la notte più tranquilla; la disfagia è un po' migliorata; un po' più accentuata la iniezione pericheratica; settima iniezione di 5 cmc. di siero. Ore 17. Temperatura 37°. 5.

29 maggio, ore 9. Temperatura 37°. 6. Notte non molto agitata; le ulcerazioni delle tonsille sono più forti; l'eruzione cutanea invariata; stazionaria la iniezione pericheratica; ottava iniezione di cmc. 5 di siero. Ore 17. Temperatura 38°. 2.

30 maggio, ore 9. Temperatura 38. Aumentata l'iniezione pericheratica;

Si sospendono le iniezioni di siero, perchè si giudica fallito il tentativo e non ci riteniamo più autorizzati a proseguirlo. Si dà principio alla cura mercuriale, sotto la quale il paziente migliora rapidamente.

OSSERVAZIONE II. — Dopo di aver tentato la siero-terapia in un caso grave, *ab initio*, l'abbiamo ritentata in un caso sfornito di qualunque gravità.

Studente di anni 18 che non ha mai sofferto malattie veneree; presenta sul foglietto mucoso del prepuzio una cicatrice superficiale, di colorito decisamente fracastoriano, con indurimento pergamenaceo alla superficie; tale cicatrice è il reliquato di una lesione di continuo, circolare, poco secernente, nata 40 giorni dall'ultimo coito fatto dal paziente, e durata, prima di cicatrizzare, per una ventina di giorni. Le glandole linfatiche inquinali di destra sono abbastanza ingrossate e indolenti. Si ha inoltre: febbre vespertina, con dolore di testa che si accresce colla febbre; dolori assai accentuati alla schiena che aumentano nelle ore notturne; un po' di faringite limitata ai soli archi palatini; nessuna traccia di lesione cutanea; mucose visibili pallide; leggera prostrazione di forze.

13 giugno 1905. Ore 9. Temperatura 37°. Prima iniezione di 4 cmc. di siero alla regione toracica destra. Ore 17. Temperatura 38°.1.

14 giugno. Ore 9. Temperatura 37°.2. Seconda iniezione di 5 cmc. Ore 17. Temperatura 37°.8.

15 giugno. Ore 9. Temperatura 36°.9; i dolori della schiena e della testa sono un po' meno forti; terza iniezione di 4 cmc. Ore 17. Temperatura 38°.

16 giugno. Ore 9. Temperatura 37; i dolori di testa e di schiena quasi scomparsi; il soggetto si lagna invece di insolita mancanza di appetito; ancora nessuna traccia di dermatosi; quarta iniezione di 5 cmc. di siero. Ore 17. Temperatura 37°.9.

17 giugno. Ore 9. Temperatura 36°.8; quinta iniezione di 6 cmc. di siero. Ore 17. Temperatura 37°.

18 giugno. Ore 9. Temperatura 36°.8. La notte è passata senza febbre e senza dolori; sesta iniezione di 7 cmc. Ore 17. Temperatura 36°.9.

19 giugno. Ore 9. Temperatura 36°.7; anche la notte scorsa è passata apirettica; settima iniezione di 8 cmc.

20 giugno, continua l'apiressia. Ore 9. Temperatura 36°.7. Si nota un leggero eritema largo quanto una mano attorno al punto d'innesto del 18 giugno (regione latero-pettorale destra); per oggi si sospende l'iniezione.

21 giugno. L'eritema tende a scomparire. Ore 9. Temperatura 36°.7.

22 giugno. Eritema scomparso; continua l'apiressia; ottava iniezione di 10 cmc. di siero.

23 giugno. Nona iniezione di 10 cmc.

24 giugno. Decima iniezione di 10 cmc.

Si nota qualche macchia roseolare ai lati dell'addome e del torace; le glandole linfatiche sono più tumefatte; le arcate palatine più arrossate.

25 giugno; la roseola aumenta; ritorna il dolore alla testa e alla schiena. Apiressia. Undecima iniezione di 10 cmc.

26 giugno. La roseola e i dolori reumatoidi e la faringite aumentano ancora.

Si ritiene il tentativo fallito; si sospende l'uso del siero e si principia la cura mercuriale.

***

Come si può dedurre da questi tentativi, *il siero di cane inoculato con filtrato di manifestazioni primarie ottenuto attraverso le Berkefeld* V, W, N, *si è dimostrato sprovvisto di qualsiasi azione curativa.*

Cessava perciò qualunque interesse diretto a studiare il modo di comportarsi di questo siero di fronte ai filtrati, al siero dei sani e dei sifilitici, a quello dei sifilitici trattati con esso o col filtrato; prove alle quali ci eravamo, sul principio della ricerca, dedicati, per completare le indagini cliniche con quelle di laboratorio.

Con tutto ciò, non vogliamo passare sotto silenzio, che, aggiungendo il siero di cane al siero dei sifilitici inoculati con lo stesso siero, abbiamo ottenuto ancora più evidente il reperto, già in altro lavoro accennato, cioè (1): delle strie appena visibili, le quali si osservano esclusivamente nei tubi dove evvi del siero con elementi cellulari disgregati. Resta però sempre a vedere come debbano essere interpretate, e se, nella pratica, abbiano un qualche valore diagnostico.

Conclusioni.

Le ricerche fin qui riferite ci portano intanto a ritenere che:

1) i filtrati amicrobici di manifestazioni sifilitiche primarie, secondarie e terziarie, inoculati nei glutei a *scopo preventivo*, parrebbe determinassero una immunità verso l'infezione sifilitica immediata al trattamento, transitoria e di brevissima durata;

2) tale immunità non può elevarsi ad indice del passaggio nel filtrato dell'agente dell'infezione, vuoi per la sua breve durata, vuoi perchè lo stesso risultato si ottiene con i filtrati di pochi giorni, come con quelli di molti, e di manifestazioni, non solo primarie e secondarie, ma anche terziarie;

3) i filtrati amicrobici di manifestazioni sifilitiche primarie, secondarie e terziarie, inoculati ripetutamente nei glutei dei sifilitici, si mostrano sforniti di qualsiasi azione terapeutica;

4) anche il siero di cane, ripetutamente inoculato con filtrati di sifilomi primari, ottenuti attraverso candele Berkefeld *V*, *W*, *N*, non esercita alcuna azione curativa.

---

(1) Questi Annali, questo fascicolo: *Se nei filtrati di manifestazioni sifilitiche ecc. si trovi l'agente dell'infezione.*

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Sulle cosidette forme "eteromorfe„ o "teratologiche„ dei batteri

Ricerche del dottor L. TRINCAS (assistente).

Se col continuo approfondirsi delle ricerche, molte importanti questioni si sono risolute e numerose controversie si sono appianate nel campo batteriologico, altrettanto non può dirsi dell'argomento che riguarda il modo di crescere e di riprodursi dei batteri e i rapporti genealogici tra forme meno evolute e forme più evolute.

Ciò è certo da mettersi in rapporto colle gravi difficoltà che complicano la risoluzione del complesso problema.

Trattasi di una questione sia pure d'indole generale, ma di capitale importanza, perchè sino a quando esisteranno delle incertezze su di essa non si potrà avere un esatto concetto della vera posizione sistematica dei batteri in genere, nè una classificazione di questi scientifica e razionale.

Diversi dati però, risultanti da recenti ricerche, tendono a delucidare certi dubbi, che esistono in proposito.

I resultati di numerose osservazioni fanno sospettare che il ciclo di sviluppo dei microrganismi non sia così semplice, come potrebbe arguirsi dallo studio di questi negli ordinari mezzi colturali.

Alcuni biologi hanno considerato ciò.

Il Gamaleïa per esempio si esprime in questo modo: « il batterio così come noi lo intendiamo sarebbe un essere immortale, perchè cresce e si divide in due e tutta la sostanza passa nelle cellule figlie. E mai ciò possibile? ».

Il Grassi dice: « negli schizomiceti, se si eccettua una notizia non ben sicura del Forster sul *Cromatium*, finora non conosciamo fenomeni di fe-

condazione. Ho perciò la convinzione che noi non conosciamo interamente il ciclo evolutivo di nessun batterio ».

Lo Schaudin infine dimostra che la formazione nelle spore di alcuni bacilli è una specie di auto-fecondazione.

Del resto che il ciclo di vita dei batteri non sia così semplice come a tutta prima si è creduto, è stato di recente provato all'evidenza per quei germi, che tra le batteriacee costituiscono il gruppo delle streptotricee, al quale si sono così potuti ascrivere il b. della tubercolosi, quello della morva e quello della difterite.

Dippiù s'è visto che per molti batteri basta modificare il substrato nutritivo ordinario, perchè si osservino delle forme singolari, sulle quali le opinioni dei vari osservatori non sono concordi.

Che i batteri, del resto, subiscano delle trasformazioni caratteristiche sotto l'azione di molte sostanze chimiche organiche e inorganiche è noto già da molto tempo a questa parte.

Guignard e Charrin, per esempio, parecchi anni or sono, dimostrarono che, il b. piocianeo coltivato in substrati contenenti determinate sostanze, andava soggetto a caratteristici mutamenti di forma.

Lo stesso reperto ebbe più tardi Wasserzug il quale vide, che il b. piocianeo s'accresceva in lunghi bastoncini mobili e in lunghi filamenti, se coltivato in terreni di nutrizione con aggiunta d'acido tartarico. Anzi secondo questo A. tutti gli antisettici in piccole dosi non danneggiano la vitalità dei germi, ma provocano in essi delle alterazioni morfologiche.

Chi però dette un ampio sviluppo a questo ordine di studi fu il Gamaleïa, il quale trovò, che l'aggiunta dei sali di litio al mezzo nutritivo, in cui vivono i batteri, determinava la comparsa di forme tutto affatto diverse da quelle che si osservano nelle colture originarie: ciò che egli comprese sotto la denominazione generale di « eteroromorfismo dei batteri ».

Così per il vibrione del colera l'aggiunta di 0.5–1 % di cloruro di litio alla coltura in brodo e di 1–2 % alla coltura di agar dava luogo alla formazione di spirilli caratteristici per la loro straordinaria lunghezza e larghezza: inoltre si notava la comparsa di forme sferiche e di filamenti di un'estrema sottigliezza.

Con queste sue indagini il Gamaleïa veniva ad applicare ai batteri, quanto il naturalista Herbst aveva osservato circa l'influenza che ha l'aggiungere all'acqua piccole quantità dei sali neutri dei metalli sullo sviluppo delle larve dell'echino marino. Specialmente il litio si dimostrò capace di provocare la formazione delle uova dell'echino marino fino allora ignote.

Recentemente il Maassen estese lo studio dell'azione dei sali di litio a più di 50 specie batteriche e notò in esse delle profonde modificazioni morfologiche con comparsa di capsule, aumento notevole di diametri delle cellule batteriche, rigonfiamenti terminali nelle stesse, e dette loro la denominazione di « forme di involuzione o teratologiche ».

Quanto ad altri sperimentatori, in massima essi, si sono solo preoccupati di descrivere grossolanamente qualcuno degli accennati cambiamenti di forma dei germi. Di fatti v'è chi parla di « aumenti tanto in lunghezza che in larghezza », di « comparsa di forme singolari, gigantesche », ecc. ecc., contentandosi di fissare semplicemente il fatto.

Ciò in parte giustifica le ipotesi disparate che sono sorte sul significato di queste forme per parte di alcuni e lo scetticismo di altri nell'ammetterne persino l'esistenza. In ogni caso spiega perchè in mancanza di dati di qualche interesse i più le abbiano considerate alla stessa stregua di quelle che Nägeli chiamò « forme di involuzione o di degenerazione » e cioè come batteri degenerati o morti.

Stando così le cose volli intraprendere delle ricerche su queste forme, convinto che ogni contributo a tale ordine di osservazioni potrà condurre a suo tempo a delle conclusioni sul significato di esse.

Iniziai il mio studio con alcune prove preliminari aggiungendo ai substrati colturali diverse sostanze chimiche, compresi i sali di litio, e mi potei presto convincere che quella che più mi si dimostrava adatta allo scopo era la caffeina, come già avea trovato il Gamaleïa. L'aggiunta di questo alcaloide ai substrati si mostrava poi particolarmente alla mano, dacchè con essa si venivano a evitare quelle abbondanti precipitazioni che si avevano, adoperando, per esempio, i sali di litio; le quali rendevano meno chiara e dimostrativa l'osservazione macroscopica e microscopica delle colture.

La caffeina venne aggiunta al brodo, all'agar e alle patate, rispettivamente nelle proporzioni di 0.40 %, 0.70 %, 1 %. Naturalmente si mise ogni precauzione perchè la sterilizzazione dei substrati fosse perfetta e perchè non avvenissero inquinamenti. Al menomo dubbio gli esperimenti si ripetevano senza tener conto di quanto si era in precedenza osservato.

I batteri che ho specialmente studiato sotto questo punto di vista, furono quelli che si riannodano ai tre tipi seguenti: *b. coli*, *b. typhi*, *b. dysentericum*. E ho scelto questo gruppo di batteri anche pel motivo che esso ha sempre sollevato numerosi dubbi circa la identifiazione delle molteplici forme, che vi appartengono: del resto, sotto questo punto di vista, esso era stato poco o nulla oggetto di studio. Non ho però mancato di aggiungervene qualche altro appartenente ad altro gruppo, e anche qualcuno sporigeno per completare le ricerche.

Tengo a far osservare che ciascun germe, di cui mi servii, venne da me previamente studiato ne' suoi caratteri morfologici, colturali e biologici per eliminare qualsiasi dubbio sulla sua identità.

Forme eteromorfe del *b. coli* nei substrati caffeinati.

Il *b. coli*, col quale iniziai le mie osservazioni, apparteneva alla collezione dell'Istituto d'igiene di Roma e si dimostrò avere tutti i caratteri propri di un tipico *b. coli* (1).

(1) Come questo era grosso e tozzo, immobile, non resistente al Gram; coagulava il latte e dava produzione di gas nelle colture anche senza l'aggiunta di zucchero. Coltivato nell'agar alla laccamuffa lattosata, secondo il metodo Drigalski-Conradi, arrossava il substrato bleu. Nell'agar al rosso

Coltivato nei substrati caffeinati presentò una serie di modificazioni morfologiche, che per maggior chiarezza espongo quali risultano dalla somma di ripetute esperienze, nella seguente forma sintetica:

Coltura in brodo caffeinato (*0. 40* %) *tenuta in termostato a 37°*:

Reperto macroscopico. — *Dopo 24 ore:* intorbidamento granuloso, sviluppo in superficie sotto forma di tanti minutissimi granuli, deposito fioccoso abbondante al fondo del tubo. *Nei giorni successivi*: l'intorbidamento diviene più forte ma è specialmente lo sviluppo in superficie che aumenta fino alla formazione di una vera e propria pellicola ininterrotta e rimontante alquanto sulla parete del tubo.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* tra le forme batteriche compaiono numerosi filamenti che prendono il colore a tratti. *Dopo 48 ore:* scarse forme batteriche: prevalgono invece le forme filamentose, che in dimensione superano quelle osservate il giorno precedente. *Dopo 4 giorni*: quasi esclusivamente forme filamentose straordinariamente lunghe, formanti un intreccio fittissimo assai caratteristico. *Dopo 5-6-7 giorni*: identico reperto. *Dopo 12 giorni:* graduale dissolvimento dei filamenti e ricomparsa di numerose forme batteriche tipiche che vanno mano mano soggette a profonda cromatolisi.

Coltura in agar caffeinato (*0. 70* %) *tenuta in termostato a 37°*.

Reperto macroscopico. — *Dopo 24 ore:* sviluppo alla superficie dell'agar di una patina grigio-giallastra sottilissima, appena appariscente, che si rende mano mano più spessa con l'ulteriore sviluppo della coltura.

Reperto microscopico. — Reperto del tutto identico a quello della coltura in brodo: cioè, comparsa di caratteristiche forme filamentose che assumono delle dimensioni sempre più grandi col progressivo sviluppo della coltura.

Coltura su patate imbevute di una soluzione di caffeina (*1* %) *tenute in termostato a 37°*.

Reperto macroscopico. — *Dopo 24 ore:* sviluppo di una tenuissima patina, umida, grigio-giallastra, non molto diffusa anche dopo un ulteriore sviluppo della coltura.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* grosse cellule ovoidali, come fornite di una capsula a doppia parete e forme batteriche tipiche. *Dopo 48 ore:* prevalgono le grosse cellule ovoidali sulle forme batteriche. *Dopo tre giorni:* quasi esclusivamente cellule ovoidali e delle forme filamentose. *Dopo 5 giorni:* comparsa ad un estremo e nel mezzo dei bastoncini dei corpi ovoidi intensamente colorati, cosicchè i batteri ricordano molto da vicino forme di plettridi e di clostridi.

Le forme osservate sono dunque del tutto diverse da quelle che si vedono nelle culture ordinarie. Si tratta anzitutto di forme gigantesche, caratteristiche specialmente perchè si presentano a filamenti che diventano sempre più lunghi sino ad assumere tali proporzioni da attraversare, indivisi o con qualche raro accenno a di-

---

neutro, secondo Rothberger, dava luogo a produzione di numerose bollicine di gas e alla caratteristica fluorescenza. Innestato sotto la cute dell'orecchio di un coniglio vi produsse un ascesso, da cui lo potei isolare in coltura pura. Era agglutinato dal siero di un asino trattato ripetutamente con colture di un tipico *b. coli*, isolato dalle feci di un bambino.

visione, l'intero campo del microscopio (fig. 1ª) e così numerosi da formare un fittissimo intreccio, assai caratteristico (fig. 1ª).

Studiate isolatamente queste forme filamentose riportano a un dipresso all'immagine di un micelio di fungo estremamente ridotto di diametro.

Faccio qui notare che la tendenza del *b. coli* a filamentarsi è da tempo nota. Il Malvoz, per esempio, parla della sua trasformazione in forme grosse e in veri filamenti, se coltivato nell'acqua di malto.

Però forme filamentose così lunghe credo da nessun osservatore siano state precedentemente descritte.

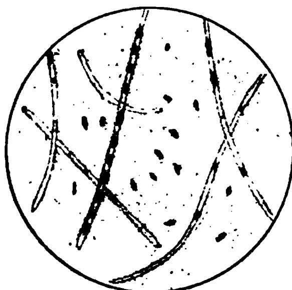

Fig. 1ª.


Fig. 2ª.

Quanto al significato da attribuire a queste forme, io ritengo di averlo potuto precisare seguendone l'ulteriore sviluppo nelle colture, dove vanno soggette a processi di segmentazione. Ciò è tanto vero che proprio da esse, seminate nei comuni terreni di coltura, ho veduto originarsi le forme piccole in tutto identiche a quelle della cultura originaria negli ordinari substrati.

È ciò del resto che succede per varie di esse negli stessi substrati caffeinati, dove si osserva, che molte di esse vanno rendendosi più rare, per essere rimpiazzate da forme piccole ordinarie. Però qui bisogna aggiunga che molte di esse vanno anche soggette a fenomeni di cromatolisi: si vedono allora prendere i colori meno diffusamente, e poi a blocchetti (v. il filamento con contenuto a granuli della figura 1ª e i due della figura 2ª).

Quanto alle forme che si osservano nelle colture su patate cioè alle grosse cellule ovali, col contorno così ben delineato che dà l'idea di una membrana ben distinta, e alle cellule dalla forma di lunghi bastoncini, dei quali alcuni apparivano rigonfiati a un estremo, altri nel mezzo, la loro interpretazione mi parve possibile dopo averne bene studiati i particolari morfologici osservandole a

forti ingrandimenti (ocul. comp. 12 obb. a immers. 2 mm. 1.30 ap. num. Koristka a tubo alzato a 160 mm.) (fig. 2ª). Colorandole infatti potei mettere in evidenza nell'interno di ciascuna di queste forme un corpicciolo ovoide, più intensamente colorato del resto della cellula, e questo corpicciuolo, una volta colorato a caldo col bleu di metilene fenico, si dimostrò resistere all'azione dell'acido solforico all'1 per cento per 20 secondi, ove però il materiale, prima di procedere alla colorazione, fosse stato fissato in una soluzione di cloruro di palladio all'1 per cento.

Usando poi come colore di contrasto l'eosina, si poterono osservare le cellule colorate in rosso, in cui risaltavano i corpiccioli ovoidali che avevano preso intensamente il bleu.

Certo per i loro caratteri questi corpiccioli erano nettamente differenziabili dai granuli metacromatici e dai granuli di grasso che si riscontrano in vari germi: ed anche ammesso che non si trattasse di vere spore esse potrebbero avere il significato delle protospore del Federowitsch poichè le critiche mosse all'interpretazione data da questo autore a ciò che egli denomina *protospore* nei batteri, non sono tali, da negare l'esistenza di questi speciali corpi indipendentemente dai granuli di grasso albuminoidi, ecc.

Riferiti questi risultati derivanti dalle ricerche fatte sopra un *b. coli* che ritenni tipico, espongo ora quelli ricavati dallo studio di altre forme dello stesso gruppo.

Studiai a tal uopo diversi *b. coli* isolati dalle feci e identificati come tali, secondo i procedimenti più in uso e alcuni tipi di *b. coli* dell'Istituto d'igiene di Roma, inviatimi gentilmente dal dott. Levi Della Vida, compreso quello isolato dal Vincenzi, del quale l'A. di recente si è servito per uno studio sui « veleni del *b. coli commune* ».

Espongo nel seguente prospetto i particolari morfologici dei *b. coli*, che si sono mostrati diportarsi alquanto diversamente da quello studiato precedentemente.

Degli altri *b. coli*, alcuni, e precisamente i *b. coli* isolati dalle feci si sono diportati in tutto ugualmente al *b. coli* riferito più sopra e gli altri ad uno dei *b. coli* riportati in questo secondo prospetto.

1ª Forma (mobile).

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Dopo 24 ore: intorbidamento diffuso. Abbondante sedimento fioccoso. *Nei giorni successivi:* progressivo aumento dell'intorbidamento e del sedimento e formazione di un velo rimontante sulla parete del tubo.

Reperto microscopico. — Dopo 24 ore: prevalenti le forme batteriche tipi-

che, ingrossate: qualche rara forma filamentosa. *Nei giorni successivi* tutte le forme filamentose andavano mano mano batteriolizzandosi e quindi rendendosi più rare.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* nessun evidente sviluppo. *Dopo 48 ore:* sviluppo di una patina sottilissima, appena appariscente, grigiastra, che si mantenne nei giorni successivi inalterata.

Reperto microscopico. — Lo stesso reperto osservato nella coltura in brodo.

Coltura su patate imbevute di una soluzione di caffeina 1 %:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* nessun evidente sviluppo. *Dopo 48 ore:* patina sottile, pochissimo visibile, che si mantenne nei giorni successivi inalterata.

Reperto microscopico. — Forme grosse, ovali, come capsulate, insieme a forme filamentose: le prime ricordanti forme plettridiche e clostridiche.

2ª Forma (mobile).

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Gli stessi presentati dalla 1ª forma mobile.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* forme batteriche e forme filamentose. *Dopo 24 ore:* prevalenti le forme filamentose che in dimensioni superano quelle osservate il giorno precedente. *Nei giorni successivi:* i filamenti si allungano sempre più, senza però raggiungere le gigantesche dimensioni ricordate per il b. coli per primo studiato.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* nessun sviluppo. *Dopo 48 ore:* sviluppo di una patina sottilissima e grigiastra, che si mantenne nei giorni successivi ma sempre poco evidente.

Reperto microscopico. — Lo stesso osservato nella coltura in brodo.

Coltura su patate imbevute di una soluzione di caffeina 1 %:

Caratteri macroscopici. — Gli stessi presentati dalla 1ª forma mobile.

Reperto microscopico. — Lo stesso presentato dalla 1ª forma mobile.

3ª Forma (immobile).

Coltura in brodo caffeinato tenuto in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* brodo appena intorbidato; scarsissimo sedimento. *Nei giorni successivi:* intorbidamento sempre leggerissimo; nessuna formazione di pellicola alla superficie del liquido.

Reperto microscopico. — Prevalenti sempre le forme batteriche propriamente dette, tra cui compaiono poche forme filamentose discretamente lunghe. Tutte le forme vanno mano mano cromatolizzandosi con l'invecchiare della coltura.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* nessun evidente sviluppo alla superficie dell'agar e identico reperto negativo dopo ulteriore sviluppo.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* forme batteriche tipiche, profondamente cromatolizzate. Reperto identico nei giorni successivi.

Coltura su patate imbevute di una soluzione di caffeina 1 %.

Caratteri macroscopici. — Nessun evidente sviluppo alla superficie delle patate.

Reperto microscopico. — Reperto del tutto identico a quello osservato nella coltura in agar.

Mentre dunque i tipi di *b. coli* isolati dalle feci presentarono tutte le particolari modificazioni riferite nel primo quadro, alcuni, e particolarmente quelli inviatimi dal dott. Levi come risulta da ciò che ho riferito, diedero luogo a filamenti, che non raggiunsero mai le considerevoli dimensioni presentate dai primi.

Inoltre questi ultimi si diportarono, dal punto di vista morfologico, diversamente nei vari substrati caffeinati: ciò che viene a dar sempre più ragione a coloro, i quali ritengono che il *b. coli* non si debba riferire ad un unico stipite, ma come il rappresentante di tutto un gruppo di forme fra loro simili, ma non identiche.

Sviluppo del *b. thyphi* nei substrati caffeinati.

Il b. del tifo che ho studiato apparteneva a uno stipite inviato molti anni fa dal compianto prof. Buchner al prof. O. Casagrandi. Esso fu oggetto di particolare studio per altro lavoro eseguito in questo Istituto e mostrò possedere tutti i caratteri corrispondenti a un tipico b. di Eberth. Reputo quindi inutile riferirli in dettaglio.

Insieme al bacillo di Eberth studiai anche i due paratifi *A* e *B* di Schottmüller e Brion-Kayser, così come li ebbi dall'Istituto di igiene di Roma. Anche di questi batteri ho creduto superfluo riportare qui la descrizione.

Coltivando il b. di Eberth e i due paratifi nei substrati aggiunti con caffeina ottenni i risultati che espongo nel seguente prospetto:

B. DEL TIFO.

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Dopo 24 ore: brodo chiaro con leggero deposito al fondo del tubo. *Nei giorni successivi*: intorbidamento leggerissimo, nessuna formazione di velo alla superficie del liquido: sempre scarso il sedimento.

Reperto microscopico. — Dopo 24 ore: forme batteriche tipiche assai ingrossate. *Dopo 48 ore:* tra le forme batteriche, delle forme più lunghe, filamentose. *Dopo 3 giorni:* forme filamentose più lunghe di quelle osservate nel giorno precedente, che andavano nei giorni successivi incontro a spiccata cromatolisi.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Dopo 24 ore: nessuno appariscente sviluppo alla superficie dell'agar. Reperto identico nei giorni successivi.

Reperto microscopico. — Esclusivamente forme batteriche propriamente dette ingrossate e in preda a profonda cromatolisi.

---

(1) Ringrazio l'egregio collega dottor Levi Della Vida per la sua gentilezza.

Coltura su patata caffeinata tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici — Lo stesso reperto osservato nella coltura in agar.

Reperto microscopico. — Lo stesso reperto osservato nella coltura in agar.

PARATIFO A.

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* brodo chiaro, leggero sedimento. *Nei giorni successivi:* brodo alquanto intorbidato, nessuna formazione di velo; sempre scarso il sedimento.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Coltura su patata caffeinata tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello ossorvato per il b. del tifo.

Peperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

PARATIFO B.

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* intorbidamento granuloso del liquido con sedimento abbondante. *Nei giorni successivi:* permangono gli stessi caratteri: più si nota la formazione di un velo in superficie.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* forme filamentose in numero discreto che permangono per alcuni giorni successivi e poi cadono in cromatolisi.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Coltura su patata caffeinata tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per il b. del tifo.

Come risulta da questo quadro il b. del tifo, in confronto al *b. coli* nei substrati caffeinati, si sviluppò assai meno rigogliosamente: la coltura in brodo restò leggermente intorbidata, scarsissimo fu il deposito al fondo dei tubi, non si ebbe alcun sviluppo in superficie, mentre il *b. coli* produsse un forte intorbidamento, un deposito abbondante e la formazione di un velo spesso, ininterrotto e rimontante sulla parete del tubo.

Del pari negli altri substrati i caratteri si mostrarono del tutto diversi. Lo sviluppo del b. di Eberth si può dire che mancò, mentre il *b. coli* si sviluppò sempre rigogliosamente. In ogni caso le forme si presentarono bensì più lunghe dell'ordinario e persino filamentose, ma mai si ebbe a notare quella rigogliosa filamentazione osservata nelle colture caffeinate seminate col *b. coli* (1).

(1) Nei mezzi caffeinati lo stipite del b. di Eberth da me studiato ebbe uno sviluppo che contrasta con quanto hanno osservato quegli autori che affermarono che la caffeina aggiunta a un terreno di nutrizione ordinario

Quanto ai due paratifi, così all'aspetto macroscopico delle colture, come all'esame microscopico, mostrarono uno sviluppo diverso, dacchè risultò che il paratifo *A* si diportava nei mezzi caffeinati come il b. del tifo e il paratifo *B* aveva uno sviluppo più rigoglioso e in esso si aveva la produzione di filamenti più lunghi e più numerosi.

Sviluppo del *b. dyssentericum* nei substrati caffeinati.

I batteri dissenterici da me studiati furono quelli del Celli, del Shiga, del Kruse, del Flexner (Manilla). I caratteri che essi presentavano erano in tutto identici a quelli messi in evidenza dal De Blasi, alla cui cortesia debbo di averli potuti studiare.

Coltivandoli nei substrati caffeinati presentarono le particolarità che espongo nella seguente tabella:

Stipite Celli.

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°.

Caratteri macroscopici. — Dopo 24 ore: intorbidamento diffuso; nessun velo in superficie, sedimento piuttosto abbondante. *Nei giorni successivi* l'intorbidamento cresce e così il sedimento.

Reperto microscopico. — Dopo 24 ore: forme batteriche ingrossate ma nessuna forma filamentosa. *Dopo 48 ore:* sempre prevalenti le forme batteriche vere e proprie; si nota già qualche forma molto allungata. *Dopo 3 giorni:* forme filamentose che appaiono qua e là tra le forme batteriche ordinarie sempre numerose. Identico reperto nei giorni successivi.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Dopo 24 ore: nessun evidente sviluppo alla superficie dell'agar. Identico reperto nei giorni successivi.

Reperto microscopico. — Forme batteriche assai ingrossate e in preda a spiccata cromatolisi.

Coltura su patate caffeinate tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Reperto identico a quello osservato per la coltura in agar.

Reperto microscopico. — Reperto identico a quello osservato per la coltura in agar.

---

impedisce lo sviluppo del *b. coli* e non quello del b. di Eberth. È noto del resto che la sensibilità di questi batteri verso la caffeina varia a seconda degli stipiti.

Il Curmont e Lacomme sono persino venuti alla conclusione che certi tipi di b. di Eberth sia che abbiano vegetato per lungo tempo in materiali colturali di laboratorio, sia che siano stati isolati di recente dal sangue d'un tifoso, sono più sensibili del *b. coli* all'azione della caffeina.

STIPITE SHIGA.

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* forme batteriche ingrossate, nessuna forma filamentosa. *Dopo 48 ore:* pur prevalendo le forme batteriche, si nota qualche forma filamentosa. Tutte le forme nei giorni successivi vanno man mano rendendosi più rare.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Coltura su patate caffeinate tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

STIPITE FLEXNER (Manilla).

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* leggerissimo intorbidamento diffuso, scarso sedimento; nessuna formazione di velo. *Nei giorni successivi:* questi caratteri rimangono invariati.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* forme batteriche ingrossate e filamentose, che vanno sempre più allungandosi nei giorni successivi e poi si cromatolizzano. *Dopo 6 giorni* le colture sono scarse di batteri.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Coltura su patate caffeinate tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

STIPITE KRUSE.

Coltura in brodo caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — *Dopo 24 ore:* brodo chiaro, scarsissimo sedimento, nessun velo. Identico reperto nei giorni successivi.

Reperto microscopico. — *Dopo 24 ore:* tra le forme batteriche vere e proprie si notano delle forme che s'allungano. *Dopo 48 ore:* filamenti in numero discreto, ondulati, a larghe volute. *Dopo 3 giorni:* filamenti a spirale più lunghi che nel giorno antecedente.

Coltura in agar caffeinato tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Coltura su patate caffeinate tenuta in termostato a 37°:

Caratteri macroscopici. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Reperto microscopico. — Identico reperto a quello osservato per lo stipite Celli.

Come si rileva dal quadro precedente i due stipiti Celli e Shiga mostrarono un analogo comportamento: infatti lo sviluppo colturale si può ritenere identico; identiche le modificazioni della cellula batterica. Qualche forma solo si filamentò come il b. di Eberth e si trattò quindi di una filamentazione che è ben lontana dall'essere così appariscente come quella del *b. coli*.

Al modo di comportarsi di questi due stipiti si avvicinò quello di Flexner (Manilla); se ne allontanò invece molto lo stipite Kruse, che nel brodo caffeinato diede luogo a lunghi filamenti, ondulati, a molteplici volute; anche lo sviluppo colturale fu del resto assai diverso.

Ciò che dimostra ancora una volta quanto siano esatte le osservazioni del De Blasi il quale ha dimostrato che pure essendo possibile riannodare attorno a un solo tipo i batteri dissenterici isolati dai vari autori, indubbiamente si ha a che fare con stipiti diversi e che il bacillo del Shiga e quello del Celli appartengono allo stesso stipite (1).

***

Come risulta dal fin qui riferito, sotto l'azione della caffeina tutti i germi studiati hanno mostrato la capacità di filamentarsi più o meno a seconda del germe: tale filamentazione è stata particolarmente accentuata per il *b. coli*, scarsissima per il b. di Eberth e per i dissenterici Celli e Shiga.

È questa ora una proprietà di tutte le batteriacee?

Per rispondere a tale quesito ho coltivato in brodo caffeinato diversi altri batteri: *b. del mal rosso*, *b. capsulatus mucosus*, *b. pneu-*

---

(1) Non posso tacere che la possibilità di provocare nei batteri la produzione di forme eteromorfe possa essere utilizzata a scopo di diagnosi differenziale fra vari germi dello stesso gruppo, ma di stipiti diversi. Spesso tra forma e forma vi sono differenze così piccole e d'altra parte è così grande il numero dei caratteri comuni, che riesce talvolta affatto impossibile la netta differenziazione di una forma dall'altra collo studio delle solite proprietà morfologiche, colturali e biologiche. In tale caso, certo, lo studio delle accennate forme eteromorfe ci potrebbe essere di sussidio. Così in base ad esse, come si vede, i vari dissenterici sono differenziabili, come anche alcune forme di *b. coli*: in tutti i modi il *b. coli* si differenzia benissimo dal b. di Eberth e dai b. dissenterici.

moniae di Friedländer, e tutti mi hanno dato pressochè lo stesso risultato del b. di Eberth. Quanto ai bacilli propriamente detti nel senso di Lehmam e Neumann, cioè alle forme allungate sporigene, come il *b. mesenterico*, il *b. sottile*, il *b. del carbonchio*, essi hanno conservato immutata la loro forma.

Quale è intanto il significato di queste forme?

Indubbiamente per molte di esse si tratta di forme viventi.

Per il *b. coli* sono infatti riuscito a dimostrare che le forme filamentose sono forme di accrescimento, dalle quali si possono avere quelle che si osservano nelle colture; escludo quindi che esse rappresentino delle forme degenerate, morte: la ricchezza e la varietà di queste forme, l'essere bene colorabili coi colori di anilina, il loro comparire al principio dello sviluppo della coltura valgono di fatti, a mio avviso, a dimostrare che tali forme sono da considerarsi tutt'altro che come forme morte.

Si potrebbe allora, trattandosi di forme viventi (in analogia a quanto si è osservato per i batteri che si sono riannodati alle streptotricee), pensare che esse ci rappresentino come un tentativo dei batteri per riportarsi a forme diverse: ma chi affermasse questo si tirerebbe addosso la rigida e severa critica di coloro, che rimangano assolutamente scettici di fronte a qualunque studio, che riveli il batterio diverso nel suo aspetto da quello che si sono abituati a vedere nelle colture ordinarie nei substrati liquidi e solidi composti secondo le note formule usate in batteriologia, e dove naturalmente la morfologia si mantiene invariata anche dopo 10-20 anni, come di recente è stato bene osservato per il *b. di Eberth* (De Rossi). Certo però si potrebbe pensare che le diverse forme batteriche siano nella fase filamentosa le omologhe dei miceli di funghi e delle cellule oidiche nella loro forma a bastoncino. La possibilità anche di generare organi che ricordano molto da vicino forme di fruttificazione, che ho osservato in modo particolare per il *b. coli*, rende l'analogia con gli ifomiceti ancora più stretta.

Io però non voglio insistere ulteriormente su questo punto: solo rileverò che l'argomento è di sommo interesse, perchè riguarda l'affinità dei batteri con gli altri esseri viventi e la loro disposizione nel sistema degli organismi.

Ad ogni modo i reperti avuti dimostrerebbero che i caratteri morfologici dei batteri non hanno quella fissità assoluta che alcuni loro attribuiscono: la costanza di essi sarebbe invece talvolta strettamente legata alla composizione dei substrati.

Conclusioni.

1° Si può, coltivando i batteri in terreni di nutrizione contenenti caffeina, ottenere delle forme che non si osservano nelle colture ordinarie.

2° Molte di queste forme non sono da considerarsi come degenerate e morte, dacchè sono capaci di dar origine alle ordinarie forme batteriche delle comuni colture; alcune inoltre parrebbero persino osservandole a forti ingrandimenti avere i caratteri di cellule sporificate: ad esse quindi, se può rimanere la denominazione di *forme eteromorfe* data loro dal Gamaleïa, non può adattarsi quella di *forme di involuzione* del Nägeli o *teratologiche* del Maassen.

3° Le modificazioni dei batteri nei substrati contenenti caffeina permettono di affermare, che la forma batterica, come noi la sogliamo trovare nei comuni terreni, è legata strettamente alla composizione sempre uguale del terreno di coltura.

4° Le forme eteromorfe si producono variamente per numero, dimensioni e forma a seconda dei germi e perciò si possono in base ad esse differenziare stipiti diversi di batteri (diversi *b. coli* fra di loro, diversi *dissenterici*, ecc.).

5° I bacilli (forme sporificanti nei comuni terreni) non pare che subiscano modificazioni nei substrati caffeinati: tale proprietà sarebbe unicamente propria dei batteri (forme allungate non sporificanti nei comuni terreni).

LETTERATURA.

GAMALEÏA. *Elemente der allgemeinen Bakteriologie.* Berlin, 1900, A. Hirschwald.

GRASSI. *Studi di un zoologo sulla malaria.* Atti Acc. Lincei, 1899.

SCHAUDINN. *Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen.* — I. *Bacillus Bütschlii.* Archiv f. Protistenkunde. Jena, 1902. G. Fischer.

SCHAUDINN. *Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen.* — II. *Bacillus sporonema.* Archiv f. Protist. Jena, 1903. G. Fischer.

GUIGNARD e CHARRIN. *Sur les variations morphologiques des microbes.* Compt. rend., 1887.

CHARRIN. *La maladie pyocyanique.* Paris, 1889.

WASSERZUG. *Variations de forme chez les bactéries.* Annales de l'Institut Pasteur, 1888, XII, pag. 75.

MAASSEN. *Die teratologischen Wachsformen (Involutionsformen) der Bakterien und ihre Bedeutung als diagnostisches Hilfsmittel.* Arbeiten aus d. Kaiser. Gesundheitsamte. 1904, Berlino, G. Springer.

MALVOZ. Archives de médecine expérimentale, 1891, III, pag. 599.

FEDOROWITSCH. *Ueber die Körnigkeit der Bakterien.* Cent. f. Bakt. II. Abt. 1902.

MARIO LEVI DELLA VIDA. *Contributo allo studio dei veleni del* b. coli comune. Questi annali, vol. XV, 1905.

COURMONT e LACOMME. *La caféine en bactériologie.* Journal de phisiologie et de patologie, 1904, pag. 286.

DE BLASI D. *Vergleichendes Studium einiger Stämme des B. dysentericum.* Ctbl. f. Bakt. I. Abt., Bd. XXXVI, 1904, p. 163.

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

Sulla reazione dell' organismo alle proteine del b. prodigioso, del b. coli e del b. del carbonchio

Ricerche sperimentali per il dottor G. B. SIMONCINI
Assistente e libero docente
(con la collaborazione del dottor Ugo Martinez).

Dalle indagini fatte in questi ultimi anni risulta che è possibile dimostrare nel protoplasma di numerose specie batteriche la presenza di sostanze tossiche, che sono o legate al corpo cellulare *in toto* (proteine), o riferibili a singoli componenti chimici di esso (nucleo-proteidi, nucleine...), e la cui importanza in diverse infezioni così dal punto di vista della patogenesi, come da quello dell'immunizzazione, non è ancora pienamente chiarita.

Così si è dimostrato che i principii a cui è dovuta la tossicità dello stafilococco, dello streptococco, del b. del tifo (Pfeiffer, Kolle, Funck, Macfadyen e Rowland, ecc.), del vibrione del colera (Pfeiffer), del b. tubercolare (Koch, Maffucci, Budden, Straus, Gamaleia, Borrel, De Giaxa...), del b. della morva (Ruppel), del b. prodigioso (Bertarelli), ecc., siano intimamente legati al corpo batterico. E ad avvalorare questo concetto sta il fatto che le culture, private dei prodotti solubili e sterilizzate, dànno nella maggior parte dei casi gli stessi effetti delle culture vive.

Nè il fatto che i filtrati delle culture vecchie sono spesso tossici può infirmare il valore di questa teoria. perchè, come dimostrarono Pfeiffer per il v. del colera e Lustig e Galeotti per il b. della peste, questa tossicità è dovuta al disfacimento dei corpi batterici in seno alla cultura.

Inoltre, che le sostanze contenute nelle cellule batteriche sieno poi, per

alcune specie di batteri, anche le più attive nell'immunizzazione contro i batteri stessi, lo mostrano i fatti osservati sperimentalmente, che cioè è possibile rendere gli animali più o meno refrattari allo stafilococco, al tifo, all'influenza, al colera, ecc., adoperando delle culture sterilizzate col calore o con sostanze chimiche (acido fenico, tricloruro di iodio, cloroformio, ecc.), non mai, o solo in grado assai debole, coi filtrati delle culture (Sanarelli, Chantemense, Widal, Pfeiffer, Fränkel, Behring, Cantani, Klemperer, ecc.).

Così pure è stato dimostrato che si può conferire agli animali un'immunità antibatterica verso alcuni batteri patogeni con le sostanze ricavate per via chimica o meccanica dai corpi delle rispettive specie batteriche.

Foà infatti immunizza i conigli con la sostanza proteica ricavata dai pneumococchi (pneumo-proteine), Bonome e Bombicci immunizzano i conigli contro lo streptococco con una sostanza (streptococcina) estratta per via chimica dallo stesso streptococco; Macfadyen e Rowland e Paladino Blandini conferiscono una solida immunizzazione agli animali da esperimento contro il b. del tifo, adoperando i primi le sostanze intracellulari dei corpi batterici del tifo, estratti con metodi esclusivamente meccanici (disintegrazione dei batteri per triturazione con polvere di argento a bassa temperatura e triturazione alla temperatura dell'aria liquida), il secondo con una sostanza, che aveva i caratteri, a dire dell'A., delle nucleo-albumine, estratta per via chimica. Lustig e Galeotti riuscirono ad immunizzare gli animali sensibili alla peste, con il nucleo-proteide ricavato direttamente, mediante un processo chimico, dai b. della peste, e così Tiberti prima e Galeotti po asseriscono di aver conferito nel maggior numero dei casi ai conigli una immunità attiva contro l'infezione carbonchiosa col nucleo-proteide da loro estratto dal b. del carbonchio.

E sebbene Bertarelli, Carega, Casagrandi, Paladino-Blandini e Vigorita non abbiamo ottenuto immunizzazione rispettivamente verso il b. prodigioso, il b. coli ed il b. del carbonchio, adoperando il nucleo-proteide estratto dai rispettivi bacilli, pure gli studi sopra riferiti, per quanto non tutti esaurienti e completi, ci mettono in grado di ritenere, in linea generale, che le sostanze contenute nel corpo dei batteri, hanno importanza non solo nell'attività patogena di essi, ma anche nell'immunizzazione. Restano però tuttavia oscuri alcuni punti intorno al meccanismo di reazione degli organismi animali verso le proteine batteriche in genere e i vari costituenti di esse in ispecie.

Su questo meccanismo di reazione abbiamo cercato di portare, per consiglio del prof. Manfredi, il nostro contributo.

Come materiale di ricerca abbiamo scelto le proteine, sia intere, sia divise nelle loro parti solubili od insolubili in alcali diluiti, di 3 batteri diversi per natura ed azione: *B. prodigioso*, *B. Coli*, *B. del carbonchio*; come reattivi i *conigli* e le *cavie*.

I.

Esperienze con la proteina del B. prodigioso.

A. — Esperienze con la proteina intera.

Le patine culturali, accuratamente asportate dalla superficie delle patate essiccate nel vuoto in essiccatore ad H_2SO_4 alla temperatura ambiente, venivano ridotte, mercè prolungata triturazione in un mortaio di porcellana, in polvere finissima, quasi impalpabile. Tale polvere, di colorito rosso-bruno, venne preparata in unica volta, in grande quantità, appunto per sperimentare sempre nelle medesime condizioni, e conservata in boccetta oscura alla temperatura ambiente; ed essendo in parte insolubile anche nei mezzi alcalini, veniva esattamente dosata volta per volta, emulsionata in acqua sterile e così inoculata.

Iniettata per la via peritoneale o sottocutanea alla dose di 1-2 mg. non determina negli animali da esperimento (cavie, conigli) alcuna azione locale apprezzabile, solo è dato di notare spesso una leggera ipertemia; alla dose di 3-4 mg. determina localmente una lieve infiltrazione leucocitaria, che presto si riassorbe e poi abbattimento generale, diminuzione del peso ed ipotermia.

Alla dose di 1 centigramma per le cavie di peso medio di gm. 400 e di 4 centigrammi pei conigli del peso di gm. 1000 si ha la morte dell'animale per tossiemia in 24-48 ore circa (secondo la via d'inoculazione, peritoneale o sottocutanea) con notevole ipotermia.

Per la via endovenosa nei conigli (gr. 1000) la proteina determina, alla dose di cgm. 2. 5 circa, forte ansia respiratoria e dopo breve tempo la morte per coagulazione intravascolare del sangue; a dosi minori leggera ipertermia.

***

Determinata la tossicità della proteina per le diverse vie, cercammo di vedere se era possibile immunizzare le cavie ed i conigli verso la stessa proteina.

A tal uopo sperimentammo complessivamente su 28 cavie e su 32 conigli, divisi in 4 serie.

Le cavie si sottopongono ad iniezioni sottocutanee ed endoperitoneali; i conigli anche ad iniezioni endovenose.

1ª *Serie*. — 4 cavie e 6 conigli ricevono in 6 iniezioni complessivamente una dose di poco superiore alla letale.

Le iniezioni sono praticate con l'intervallo di 5 giorni (quando cioè la temperatura ed in parte il peso ritornano al normale).

Muoiono tutti alla 3ª iniezione.

2ª *Serie.* — 4 cavie e 6 conigli ricevono egual numero di iniezioni e complessivamente uguale dose della serie precedente. L'intervallo fra una iniezione e l'altra è di 10 giorni.

Nessun animale sopravvive alla 3ª iniezione.

3ª *Serie.* — 8 cavie e 8 conigli ricevono nello spazio di 50 giorni n. 5 iniezioni con una dose complessiva uguale alla letale minima.

Sopravvivono quasi tutti (qualche animale muore per cause accidentali).

Di questi animali sopravvissuti muoiono tutti quelli inoculati 10 giorni dopo l'ultima iniezione sia con la dose letale minima che con una dose massima sub-letale; di quelli iniettati 30 giorni dopo l'ultima iniezione, muoiono quelli iniettati con la dose minima letale, sopravvivono invece quelli iniettati con la dose sub-letale.

4ª *Serie.* — 12 cavie e 12 conigli ricevono nello spazio di 180 giorni 6 iniezioni di dosi sempre non letali, ma progressivamente crescenti.

Sopravvivono 10 cavie e 9 conigli.

Di questi muoiono 2 cavie ed 1 coniglio inoculati dopo altri 30 giorni con la dose letale minima.

In generale il peso degli animali così trattati si abbassava e spesso notevolmente nei primi 2 giorni per rialzarsi al 4° o 5°, ma quasi mai completamente. La temperatura si innalzava subito dopo l'azione di piccole dosi per ritornare normale al 3° o 4° giorno; si abbassava invece più o meno notevolmente sotto l'azione di dosi che si avvicinavano alla letale.

Dai risultati ottenuti dalle precedenti esperienze emergono due fatti:

1° è impossibile assuefare gli animali a sopportare delle dosi letali, sieno pure minime, di proteina del b. prodigioso;

2° è possibile di far sopportare agli animali delle dosi frazionate complessivamente superiori alla letale minima solo quando le iniezioni vengono praticate con assai lunghi intervalli di tempo (30 giorni almeno); quando cioè sono del tutto scomparsi gli effetti prodotti dalla iniezione precedente.

Il rilievo di questi due fatti ci autorizza a conchiudere che la proteina del b. prodigioso ha nell'organismo animale azione tossica cumulativa e che è impossibile con essa ottenere un'immunizzazione verso la stessa proteina.

***

Vista la impossibilità di immunizzare gli animali verso la proteina, abbiamo voluto vedere se era possibile di ottenere, con questa, un'immunizzazione verso il b. prodigioso vivo.

A tal uopo 6 cavie e 6 conigli, superstiti al trattamento precedentemente descritto e sottoposti ad una nuova iniezione di una dose massima subletale di proteina, vengono inoculati per la via peritoneale, 10 giorni dopo

la nuova iniezione, con brodocultura di prodigioso, tenuta per 24 ore a 37° C.

La dose letale minima di brodocultura di prodigioso era per la via peritoneale: per le cavie (gm. 400) cmc. 0.2; per i conigli (gm. 1000) cmc. 0.5.

N. 2 cavie sane (per controllo) vengono inoculate con cmc. 0.25 di brodocultura;

n. 4 cavie proteinizzate, con cmc. 0.25;

n. 2 cavie proteinizzate, con cmc. 1;

n. 2 conigli sani (per controllo), con cmc. 0.6 di brodocultura;

n. 4 conigli proteinizzati, con cmc. 0,6 di brodocultura;

n. 2 conigli proteinizzati, con cmc. 2 di brodocultura.

Le due cavie sane di controllo e le due cavie proteinizzate inoculate con cmc. 1 di brodocultura muoiono infra le 24 ore; le due cavie proteinizzate ed inoculate con cmc. 0.25 di brodocultura invece sopravvivono dopo un profondo abbattimento.

Dei conigli, i controlli e quelli inoculati con cmc. 2 di brodocultura muoiono infra le 24 ore, degli altri inoculati con una dose di brodocultura di poco superiore alla letale minima, uno muore e 3 sopravvivono.

Le ripetute iniezioni di dosi subletali di proteina intera del b. prodigioso determinano dunque nel maggior numero dei casi nelle cavie e nei conigli una debole immunità verso il b. prodigioso vivo.

Volendo darci conto del modo con cui l'organismo animale reagiva alle iniezioni ripetute di proteina, praticammo sul siero di sangue di alcuni animali (2 conigli e 2 cavie) proteinizzati, 10 giorni dopo l'ultima iniezione di proteina, i saggi opportuni per constatare se il siero era dotato di potere antiproteinico, agglutinante e battericida verso il b. prodigioso vivo.

Raccolta asetticamente nella maniera più scrupolosa una buona quantità di sangue dall'arteria femorale degli animali proteinizzati, lo si centrifugava con centrifuga elettrica sino ad avere la separazione d'un siero perfettamente limpido.

Questo veniva poi iniettato in varie proporzioni e per diverse vie sia nelle cavie che nei conigli assieme alla dose letale di proteina:

a) contemporaneamente per la stessa via;

b) contemporaneamente e per diversa via;

c) dopo d'essere tenuto a contatto con essa per 6 ore.

Gli animali muoiono tutti nello stesso tempo in cui muoiono i controlli (24-36 ore); il siero di sangue dunque degli animali proteinizzati non acquista alcun potere antiproteinico.

*
* *

Il siero di sangue di conigli e di cavie proteinizzate e sane è diluito convenientemente con brodo sterile in modo da avere delle diluizioni 1 : 10; 1 : 20; 1 : 50; 1 : 100 1 : 200; 1 : 500; 1 : 1000.

In ciascuna diluizione si porta un'ansa di una emulsione di cultura fresca in agar di b. del prodigioso, che esaminata al microscopio, lascia vedere i bacilli mobili e isolati l'uno dall'altro.

Da ciascuna diluizione, a vari intervalli di tempo, si fanno preparati a goccia pendente e dai numerosi saggi fatti si rileva quasi constantemente che mentre il siero di sangue degli animali sani non esercita sui b. del prodigioso alcuna azione agglutinante apprezzabile (si ha solo agglutinazione alla diluizione di 1:10 e 1:20 in qualche raro caso), il siero degli animali proteinizzati esercita sui b. del prodigioso un'azione agglutinante manifesta (fino alla diluizione di 1:100 circa).

Saggio del potere battericida in vivo. — Abbiamo qui praticato il saggio di Pfeiffer, ed abbiamo potuto assistere alla graduale e completa dissoluzione dei bacilli del prodigioso nel cavo peritoneale delle cavie.

Bisogna quindi ammettere che il siero degli animali proteinizzati aveva in vivo azione battericida specifica.

B. — Esperienze con la parte della proteina solubile in alcali diluiti.

La proteina batterica, finissimamente polverizzata, veniva emulsionata in soluzione di carbonato sodico al 0.5 per cento nella proporzione dell'uno per cento.

L'emulsione veniva fatta a temperatura ambiente in un mortaio di porcellana, aggiungendo la soluzione alcalina goccia a goccia in modo da avere una massa più o meno densa che veniva lasciata a sè per 15 giorni, dopo sterilizzazione frazionata a 60° C.

Dopo di che veniva filtrata attraverso ad un doppio filtro di carta Schleicher e del filtrato piuttosto limpido, che veniva a tenere in soluzione la parte della proteina solubile in alcali, ci servivamo per le nostre esperienze.

Per sapere la quantità di proteina disciolta nel filtrato pesavamo alla bilancia di precisione i filtri prima e dopo la filtrazione (previamente essiccati alla temperatura ambiente in essiccatore ad H_2SO_4).

La differenza fra la 2ª e la 1ª pesata dava la quantità di sostanza indisciolta, e quindi indirettamente anche di quella disciolta (1). La soluzione da noi adoperata conteneva grammi 0.007 di sostanza disciolta.

La dose minima letale per le cavie di grammi 400 è di cmc. 2.5 di soluzione alcalina (cioè gm. 0.0175 di sostanza solubile in alcali) per la via peritoneale e di 3.5 cmc. circa, per la via sottocutanea.

Per i conigli di gm. 1000 era di cmc. 9-10 per la via endovenosa, cmc. 14 per la peritoneale e cmc. 20 per la sottocutanea.

---

(1) Da diverse determinazioni abbiamo rilevato che la dissoluzione della proteina allo stato secco aumentava coll'aumentare del numero dei giorni di macerazione, raggiungendo il massimo dopo 15 giorni, difatti mentre la parte di proteina disciolta dopo 48 ore era del 60 per cento, dal 15° giorno in poi era del 70 per cento circa.

Con appositi saggi abbiamo potuto poi anche constatare che la dissoluzione della proteina allo state umido è maggiore, potendosene sciogliere perfino l'80 per cento, (s'intende di sostanza riferita allo stato secco).

***

Tralasciamo di riferire dettagliatamente tutti i tentativi fatti per immunizzare gli animali verso la parte della proteina solubile in alcali, simili del resto a quelli adoperati con la proteina intera.

Diremo solo che sperimentammo anche qui su cavie e conigli, iniettando il materiale per diverse vie (sottocute, peritoneo, vene), e che i risultati avuti ci autorizzano a concludere che anche la parte della proteina del prodigioso solubile in alcali ha azione tossica cumulativa nell'organismo animale e che non è possibile assuefare gli animali a tollerare dosi letali, sia pure minime, di essa.

Dagli altri saggi fatti risulta che le iniezioni ripetute di parte solubile di proteina non conferiscono al siero di sangue degli animali nè azione antiproteinica, nè azione battericida, solo in qualche caso un leggiero potere agglutinante che non va al di là di 1 : 20.

Con questa sostanza non è possibile neanche di immunizzare gli animali verso il b. prodigioso vivo.

C. — Esperienze con la parte di proteina insolubile in alcali.

La parte insolubile in alcali, separata per filtrazione dalla parte solubile, disseccata in essiccatore ad H_2SO_4, è resa, mercè triturazione in mortaio, sotto forma di polvere finissima.

Detta polvere uccide le cavie (400 grammi) per la via peritoneale alla dose di gm. 0.005 ed i conigli (1000 grammi) alla dose di gm. 0.025 per la via peritoneale e di gm. 0.02 circa per la via endovenosa.

Gli animali (cavie, conigli), iniettati per le diverse vie con dosi refratte inferiori alla letale minima e con l'intervallo di 10 giorni fra l'una e l'altra iniezione, muoiono tutti appena vengono a ricevere complessivamente la dose letale.

Gli animali invece sopportano dosi progressivamente crescenti, ma sempre singolarmente inferiori alla letale, purchè la iniezione sia fatta con un grande intervallo di tempo (30-40 giorni), la ulteriore iniezione di una però dose letale, sia pure minima, determina costantemente la morte di essi.

Di 4 conigli e 4 cavie proteinizzati nessuno sopravvive all'inoculazione nel peritoneo di una dose letale minima di brodocultura di b. del prodigioso.

***

Dalle esperienze fatte con la proteina del b. prodigioso risulta quindi che:

1° La proteina del b. prodigioso è una sostanza tossica, dotata di azione cumulativa negli organismi animali.

Essa è per la massima parte (70-80 %) solubile in alcali diluiti, già a temperatura ambiente, però la sua dissoluzione è lenta e graduale e raggiunge il suo massimo dopo una macerazione di 15 giorni, e grazie alla sua parziale solubilità in alcali è possibile separare dall'estratto alcalino la parte solubile e la insolubile.

Le due parti isolate sono anch'esse dotate di azione tossica e cumulativa, la maggiore azione tossica è data però dalla parte insolubile in alcali.

2° Nè la proteina intera, nè alcuno dei 2 costituenti isolati è capace di conferire al siero di sangue degli animali (cavie, conigli) potere antiproteinico.

3° La proteina intera conferisce al siero di sangue delle cavie e dei conigli un mediocre potere agglutinante ed un forte potere battericida e determina in essi, sebbene non in tutti i casi e in una maniera appena notevole, un'immunizzazione verso il b. prodigioso vivo.

4° I due costituenti della proteina (parte solubile ed insolubile in alcali), adoperati separatamente, non conferiscono al siero di sangue degli animali nè potere agglutinante, nè battericida e non determinano negli animali immunità verso il b. prodigioso vivo.

Anche Bertarelli tentò di immunizzare gli animali da esperimento e sopratutto le cavie contro l'intossicazione da prodigioso. I tentativi da lui eseguiti, inoculando brodocultura filtrata e nucleoproteide, gli hanno dato risultato negativo.

Con l'inoculazione di culture uccise col calore (patine da agar e brodo-culture) e di culture vive, ottenne risultati incerti: di circa 30 animali inoculati, solo in 4 ebbe risultati positivi: però in questi si trattava di un'immunizzazione molto relativa, perchè gli animali non resistevano che ad una dose di cultura viva di poco superiore alla minima letale.

II.

Esperienze con la proteina del b. coli.

A. — Con la proteina intera.

Il metodo seguito per la preparazione di questa proteina è identico a quello tenuto per la proteina del b. prodigioso, ed identica ne è l'azione locale e generale negli animali.

La dose letale minima è per le cavie di 300 gm., gm. 0.006 per la via peritoneale, e gm. 0.008 per la sottocutanea; per i conigli di gm. 900 è di gm. 0.025 per la via endovenosa e di gm. 0.04 per la via endoperitoneale.

Numero 18 cavie e 18 conigli, divisi in 3 serie, vengono iniettati per diverse vie con dosi refratte, inferiori alla letale minima, rispettivamente con l'intervallo di 10, 20 e 30 giorni.

Gli animali della 1ª serie (4 cavie e 4 conigli) muoiono tutti appena vengono a ricevere complessivamente una dose di proteina superiore, di ¼ circa, alla letale.

La stessa sorte subiscono gli animali della 2ª serie (4 cavie e 4 conigli).

Di quelli della 3ª serie che ricevono complessivamente una dose di proteina di poco superiore alla letale, con l'intervallo di 30 giorni fra una iniezione e l'altra, sopra 10 cavie e 10 conigli sopravvivono 6 cavie e 8 conigli.

Nessuno animale però superstite sopporta la dose minima letale di proteina, inoculata in unica volta. (Il peso e la temperatura si comportano in linea generale come con la proteina del prodigioso).

La proteina del b. coli quindi è dotata di azione tossica cumulativa e non conferisce agli animali immunizzazione antiproteinica specifica.

***

Degli animali proteinizzati, superstiti della suddescritta 3ª serie (4 conigli e 4 cavie), inoculati per la via peritoneale parte con la dose minima letale (0.25 cmc. per le cavie e 0.75 cmc. per i conigli) e parte con una dose quasi doppia di brodocultura di b. coli, sopravvivono solo quelli inoculati con la dose minima letale, mentre gli animali di controllo e quelli inoculati con una dose letale doppia muoiono nello spazio di 48 ore circa.

Dagli appositi saggi fatti risulta poi che la proteina del b. coli non conferisce al siero di sangue degli animali potere antiproteinico, ma gli conferisce invece potere agglutinante che oscilla da 1 : 50 a 1 : 100 (il siero normale agglutina i bacilli nella diluizione di 1 : 10, 1 : 20 in qualche rarissimo caso) e limitato potere battericida.

B. — Esperienze con la parte solubile in alcali diluiti.

Il filtrato, attraverso doppio filtro di carta Schleicher, dell'estratto alcalino della proteina del *b. coli*, tenuto in macerazione per 20 giorni, contiene disciolto il 65 per cento di proteina circa.

Esso è tossico per le cavie ed i conigli ed uccide le prime alla dose di 4 cmc. per la via sottocutanea, e di 3.5 cmc. per la via peritoneale: i secondi alla dose di 9, 13 e 17 cmc. rispettivamente per la via endovenosa,

endoperitoneale, sottocutanea, determinando fatti locali e generali identici a quelli provocati dalla proteina intera.

Le esperienze vengono praticate su cavie e conigli divisi anche qui in tre serie. I risultati sono quasi identici a quelli ottenuti con la proteina intera; è degno però di rilievo un fatto che cioè qualche animale arriva a sopravvivere alle iniezioni refratte di una dose di filtrato complessivamente superiore alla letale e che di quelli dell'ultima serie muoiono durante il lungo trattamento una sola cavia e un solo coniglio.

Alcuni animali (4 cavie e 4 conigli) sopravvissuti al trattamento di quest'ultima serie vengono inoculati nel peritoneo, parte con la dose minima letale e parte con una dose superletale di brodocultura di *b. coli*. Tutti e 8 gli animali muoiono nello spazio di 36 a 72 ore assieme ai controlli.

I saggi fatti sul siero di sangue di altri animali proteinizzati, dimostrarono che esso è sprovvisto di potere antiproteinico, agglutinante e battericida.

La parte solubile in alcali della proteina del *b. coli* è quindi tossica, dotata nella maggioranza dei casi di azione cumulativa ed incapace di conferire agli animali immunizzazione antiproteinica specifica ed al siero di sangue di essi potere antiproteinico, agglutinante e battericida.

C. — Esperienze con la parte insolubile in alcali.

La parte insolubile in alcali, essiccata in essiccatore ad H_2SO_4 alla temperatura ambiente, è fortemente tossica; uccide le cavie per la via endoperitoneale con gm. 0.008 ed i conigli per la via endovenosa con gm. 0.02 e con gm. 0,003 circa per la via endoperitoneale, con notevole ipotermia.

Gli animali trattati con iniezioni ripetute di dosi frazionate di tale sostanza muoiono appena vengono a ricevere complessivamente la dose letale minima; sopravvivono, e non tutti, quando le iniezioni vengono praticate con lunghi intervalli di tempo (30 a 40 giorni).

Gli animali dimagrano rapidamente e notevolmente.

Non è mai possibile far sopportare ad alcun animale, dopo un lungo e ripetuto trattamento, nè la dose minima letale della parte della proteina del *b. coli* insolubile in alcali, nè la dose minima letale di brodocultura di *b. coli*.

Il siero degli animali proteinizzati non acquista nè azione antiproteinica, nè agglutinante, nè battericida.

Riassumiamo i risultati ottenuti con la proteina del *b. coli*:

1° La proteina del *b. coli* è una sostanza tossica, dotata di azione cumulativa, solubile in massima parte (65 % circa) in alcali diluiti.

2° Di azione tossica e cumulativa sono dotate anche le parti di essa solubili e insolubili in alcali; però quest'ultima parte è quella dotata della maggiore azione tossica e della maggiore azione cumulativa.

3° È impossibile assuefare gli animali a sopportare delle dosi letali minime di proteina e, rispettivamente, della parte solubile ed insolubile in alcali; non è possibile quindi ottenere immunizzazione antiproteinica.

4° Le ripetute iniezioni di proteina intera del *b. coli* conferiscono al siero di sangue degli animali debole potere agglutinante e discreto potere battericida e determinano negli animali, quasi sempre, una debole immunizzazione antibatterica; nulla avviene se si adoperano i due costituenti della proteina separatamente.

***

Il Carega, il quale si è occupato dello stesso argomento, ha trovato anche lui che, della proteina del *b. coli*, la parte insolubile (nucleina) e la parte solubile in alcali, riprecipitabile con acidi diluiti (nucleo-proteide, dall'A. chiamata nucleo-albumina) erano dotate di azione tossica.

Per quanto riguarda l'azione cumulativa trova che mentre la nucleina è dotata d'azione cumulativa, non lo è la nucleo-albumina, differenza constatata anche da noi, solo però per qualche animale.

L'A. trova infine anche lui che non è possibile immunizzare i conigli verso il *b. coli*, adoperando come sostanza vaccinante la nucleo-albumina; con la nucleina non fa alcun tentativo di immunizzazione antibatterica.

III.

Esperienze con la proteina del b. del carbonchio.

Le esperienze sul carbonchio destarono in noi un maggiore interesse, tenuto conto del fatto che parecchi sperimentatori, di cui riferiamo brevemente i lavori, si erano già occupati dell'argomento, ottenendo risultati discordanti fra loro.

Casagrandi infatti tentò d'immunizzare i conigli mediante gli estratti batterici (proteine) fatti col metodo di Koch e di Behring, ma ebbe risultati negativi.

Ripetè poi le esperienze, servendosi del nucleo-proteide (metodo Lustig-Galeotti) e lo inoculò sottocute ai conigli in soluzioni sature fatte in carbonato sodico al 0.25 per cento o in carbonato sodico 0.25 per cento 1 p. e cloruro sodico 0.85 4 p.

Gli animali (6 conigli), così trattati, dimagravano notevolmente e presen-

contatto di questi ultimi con la soluzione si protragga per 3-4 giorni alla temperatura di 20-25 C. e agitando spesso con una spatola sterilizzata. Non dice nella nota nè qui la quantità di nucleo-proteide che veniva sciolta nella soluzione di carbonato sodico.

Riporta i risultati di una seconda serie di esperienze fatte su 12 conigli, cui inietta una maggiore quantità di nucleo-proteide. Di questi 12 conigli, iniettati poi con cc. 0·5 di brodocultura di carbonchio, 9 sopravvissero e 3 morirono di carbonchio dopo 6-8 giorni.

L'A. ultimamente inoculando il nucleoproteide ha tentato immunizzare gli agnelli dal carbonchio.

Galeotti, sperimentando su due soli conigli, trova anche lui che il nucleo-proteide del b. del carbonchio immunizza attivamente i conigli.

Vigorita invece, pur estraendo il nucleo-proteide con due metodi (tra cui quello adoperato da Galeotti e Tiberti), lo trova privo di azione immunizzante.

Riassumendo quindi Casagrandi, Paladino-Blandini, Vigorita non riescono mai ad immnnizzare le cavie ed i conigli contro il carbonchio, adoperando sia le proteine sia il nucleo-proteide del b. carbonchioso; Tiberti invece e Galeotti ottengono l'immunizzazione sui conigli; il 1° su due terzi dei conigli e su 2 fra quattro ovini sperimentati, il 2° sui 2 conigli sui quali sperimentò.

A. — Esperienze con la parte solubile in alcali della proteina del b. del carbonchio.

Avendo constatato con ripetuti saggi che nelle culture in agar tenute a 37 C., già dopo 24 ore il b. del carbonchio dà luogo alla formazione di spore e non essendo d'altra parte riusciti ad ottenere un carbonchio asporigeno col metodo di Roux (all'acido fenico), per ottenere delle culture prive o almeno contenenti uno scarsissimo numero di spore, ricorremmo alle culture in agar tenute per 2, 3 giorni al massimo ad una temperatura di 17-18 C.

Le patine culturali raccolte dalla superficie dell'agar con una spatola di platino, vennero messe a macerare rispettivamente in soluzione di KOH all'1 ed al 5 % (giusta le indicazioni date da Tiberti e Paladino-Blandino) per 5 giorni ad una temperatura di 18 C., agitando di tanto in tanto con spatola sterilizzata. (In 250 cmc. di soluzione di KOH vennero messe a macerare le patine sviluppate da cmc. 600 di agar distribuito in grossi tubi da saggio e fatti solidificare a becco di flauto. Ricorremmo ai tubi e non alle piastre perchè la raccolta del materiale dai tubi era assai più facile e completa).

Dopo tale trattamento si notava al fondo dei due matracci, contenenti le due soluzioni alcaline, un abbondante sedimento fioccoso, il quale nella soluzione all'1 % lasciava scorgere al microscopio un grande numero di bacilli in parte inalterati nella forma e nella colorabilità; nella soluzione al 5 % dei bacilli in massima parte non tingibili coi colori di anilina o contenenti al più delle granulazioni ancora tingibili.

Le due soluzioni inoltre contenevano, sebbene in scarsissimo numero,

delle spore; erano desse infatti rilevabili con la sola prova biologica (inoculazione negli animali delle soluzioni tenute per 10′ a 70° C.).

Per separare la parte già sciolta dalla indisciolta filtrammo le emulsioni attraverso doppio filtro di carta Schleicher. La parte indisciolta (la massima parte) rimasta sui filtri venne essiccata in essiccatore ad H_2SO_4, e polverizzata.

I due liquidi filtrati limpidi, contenenti la parte della proteima solubile in alcali, vennero trattati con una soluzione molto diluita di acido acetico sino a reazione leggermente acida, allo scopo di precipitarne il nucleoproteide.

Però in tutti e due i liquidi si ebbe solo dopo parecchie ora la formazione di un così scarso precipitato, che non credemmo conveniente di raccogliere.

Preparammo quindi due nuove soluzioni di KOH (una all'1 % ed una al 5 %) ed una 3ª di Na_2CO_3 al 0.25 %, mettendo a macerare in ciascuna di esse una grande quantità di patine culturali (in 300 cmc. di soluzione le patine raccolte da 2 litri di agar) e sterilizzando il tutto frazionatamente a 65° C. per un'ora almeno e per tre giorni consecutivi.

Dopo 15 giorni filtrammo con tutte le possibili cautele le 3 emulsioni attraverso doppio filtro Schleicher e tentammo di precipitare il nucleo-proteide da alcune porzioni di esse.

Essendo però anche qui scarso il precipitato che veniva a formarsi, fummo costretti a servirci per le nostre esperienze dei filtrati, contenenti la parte della proteina del b. del carbonchio solubile in alcali.

Non potemmo però servirci della soluzione di KOH al 5 % perchè essa già alla dose di cmc. 5 determinava la morte delle cavie.

Data la piccola quantità di nucleo-proteide contenuto nelle due soluzioni di KOH e Na_2CO_3 (1 cmc. di soluzione di KOH conteneva gm. 0.00045 di sostanza disciolta; 1 cmc. di soluzione di Na_2CO_3 conteneva gr. 0.00042 di sostanza disciolta), abbiamo dovuto rinunziare alla determinazione della dose letale e limitare il numero delle esperienze.

***

N. 4 conigli ricevono nello spazio di 40 giorni ed in 4 iniezioni complessivamente e rispettivamente 88 cmc. di soluzione di KOH e 95 cmc. di soluzione di Na_2CO_3, cioè 40 mgm. di sostanza proteica disciolta.

N. 4 cavie ricevono nello spazio di 40 giorni ed in 4 iniezioni complessivamente 10 mgr. di sostanza disciolta.

Questi animali dopo 15 giorni dall'ultima iniezione vengono inoculati, assieme a 2 conigli e 2 cavie sane per controllo, con una dose letale di brodocultura di carbonchio di 24 ore, fortemente agitata e filtrata attraverso carta (cmc. 0.1 per le cavie e cmc. 0.5 per i conigli).

Le cavie muoiono tutte per setticemia carbonchiosa nello spazio di 40-48 ore.

Dei conigli quelli di controllo e quelli trattati colla parte di proteina disciolta in Na_2CO_3 muoiono di carbonchio nello spazio di 64-72 ore, quelli inoculati con la parte di proteina disciolta in KOH muoiono anch'essi di carbonchio però con un ritardo sui controlli (uno muore dopo 5 ed uno dopo 6 giorni).

I risultati di queste poche esperienze vengono a confermare i risultati ottenuti da Casagrandi, Paladino-Blandini, Vigorita e Tiberti (per quanto riguarda le sole cavie) ed a contraddire quelli ottenuti da Tiberti e Galeotti per i conigli; d'altro canto il ritardo avuto nella morte dei conigli inoculati con soluzione di KOH all'1 °/₀ può trovare la sua spiegazione nei risultati ottenuti da Fodor che cioè gli alcali influiscono favorevolmente sul decorso dell'infezione carbonchiosa.

Dato ciò si potrebbe dubitare che i risultati positivi avuti da Tiberti fossero dovuti in parte alla soluzione di $Na_2 CO_3$ al 2 °/₀ che teneva sciolto il nucleo-proteide; ma non sapendo, perchè l'A. non lo dice, la quantità complessiva di soluzione alcalina che veniva iniettata negli animali, ci asteniamo da qualsiasi considerazione.

B. — Esperienze con la parte insolubile in alcali.

Questa sostanza, preparata e conservata nel modo precedentemente descritto (vedi esperienza colla parte solubile), iniettata per la via sottocutanea, uccideva le cavie di grammi 300 alla dose di 1 cgm. ed i conigli di grammi 800 circa alla dose di 3 cgm.

***

3 conigli e 3 cavie ricevono per la via sottocutanea nello spazio di 40 giorni ed in 4 inoculazioni complessivamente una dose di poco inferiore alla minima letale.

Inoculati dopo 15 giorni dall'ultima inoculazione con brodocultura di carbonchio (cmc. 0.1 per le cavie; 0.5 per i conigli) muoiono tutti più presto dei controlli.

2 conigli e 2 cavie ricevono complessivamente in 40 giorni ed in 4 inoculazioni una dose superiore alla letale; muoiono tutti in seguito all'ultima iniezione.

Dunque la parte della proteina carbonchiosa insolubile in alcali ha azione tossica e cumulativa e non determina negli animali immunizzazione antibatterica specifica.

C. — Esperienze con la proteina intera.

Ci siamo qui serviti delle patine culturali essiccate e sterilizzate a 100.

5 conigli e 5 cavie ricevono per la via sottocutanea nello spazio di 40 giorni ed in 4 inoculazioni una dose di poco inferiore alla letale emulsionata in acqua sterile (gm. 0.009 per le cavie e gm. 0.023 per i conigli). Di questi animali 3 conigli e 3 cavie vengono inoculate 15 giorni dopo l'ultima inie-

zione con brodocultura di carbonchio (0.1 cmc. per le cavie e cmc. 0.5 per i conigli) per la via sottocutanea. Muoiono tutti di carbonchio assieme ai controlli.

I 2 conigli e le 2 cavie superstiti vengono sottoposti dopo 18 giorni dall'ultima iniezione ad una nuova iniezione di una dose sub-letale di proteina; si veniva così ad iniettare agli animali complessivamente una dose di proteina superiore alla letale.

Di questi 4 animali nessuno sopravvive.

Per quanto limitate sieno state le esperienze, pure, tenuto conto dei risultati avuti, dobbiamo ritenere che la proteina del b. del carbonchio è una sostanza tossica, dotata di azione cumulativa, ed insolubile per la massima parte in alcali diluiti.

Essa, adoperata sia intera, sia divisa nella parte solubile ed inso lubile in alcali, non è capace di immunizzare le cavie ed i conigli contro il b. del carbonchio vivo.

Conclusioni generali.

1° Il protoplasma batterico del bacillo prodigioso, b. coli e b. carbonchioso contiene sostanze più o meno tossiche, dotate di azione cumulativa nell'organismo animale e parzialmente solubili negli al cali diluiti.

La parte solubile, che è quella dotata di minore tossicità è massima nel protoplasma del b. prodigioso e del b. coli, minima in quello del b. del carbonchio.

2° La proteina del b. prodigioso e del b. coli, adoperata sia intera, sia divisa nella parte solubile ed insolubile in alcali, non è capace di determinare nel siero di sangue degli animali (cavie, conigli) la produzione di anticorpi specifici, nè di determinare negli animali immunizzazione antiproteinica.

3° È possibile di determinare negli animali, e non in tutti i casi, una assai limitata immunità verso il b. prodigioso ed il b. coli vivi, adoperando come sostanza vaccinante la proteina intera dei rispettivi batteri.

Nessuna azione esercitano invece le parti di essa solubili ed insolubili in alcali, adoperate separatamente.

4° Non è possibile immunizzare verso il carbonchio le cavie ed i conigli, adoperando come sostanza vaccinante sia la proteina intera del b. del carbonchio, sia la parte di essa solubile o la insolubile in alcali.

***

Dalle conclusioni già enunciate emerge un fatto che s'impone alla nostra osservazione, cioè che mentre è possibile in un certo numero di casi, immunizzare, sia pure in una maniera assai limitata, gli animali verso il b. prodigioso ed il b. coli vivi, con la proteina intera dei rispettivi batteri, ciò non è possibile adoperando separatamente i costituenti di essa (parte solubile ed insolubile in alcali).

Quale la spiegazione di questo fatto?

Conoscendo dalla chimica che le sostanze proteiche in genere sono tra le sostanze organiche le più complesse e le più instabili ad un tempo, tanto che sono facilmente modificabili sotto l'azione del calore, di sali e perfino di reattivi per sè debolissimi, e conoscendo, d'altra parte, quanto dice Oppenheimer in proposito, che cioè probabilmente l'energica estrazione, per via chimica, delle sostanze contenute nelle proteine batteriche altera per lo più talmente quel delicato aggruppamento atomico che costituisce la complessa molecola proteinica, che alla sua introduzione nell'organismo non segue nessuna od una assai debole produzione di sostanze battericide, si può con probabilità ammettere che la differenza dei risultati sia dovuta all'azione esercitata dal trattamento chimico sulle proteine batteriche.

BIBLIOGRAFIA.

Bertarelli. *Ricerche ed osservazioni sulla biologia e patogenicità del b. prodigioso.* Archivio per le scienze mediche, 1903. Centralblatt für Bakteriol., 1903.

Besson A. *Tecnica microbiologica e sieroterapica.* Traduzione italiana, Torino, 1903.

Bonome e Bombicci. *Sulle proteine degli streptococci e sulla sieroterapia antistreptococcica sperimentale.* Riforma medica, 1899, vol. I, n. 7, 8, 9, pag. 75, 87, 99.

Bottazzi. *Chimica fisiologica.* Milano, 1899.

Brieger. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 15, 1891, s. 134.

Buchner H. *Ueber pyogene Stoffe in der Bacterienzelle.* Berl. Klin. Wochenschr. Bd. 90, s. 673, u. s. 1084.

Carnevali. *Sull'azione locale e generale degli estratti dei corpi batterici.* Questi Annali, 1902, vol. XII, pag. 301.

Carbga A. *Ueber die aktiven substanzen des B. coli.* Centralblatt f. Bakt. Originale, 1903, Bd. 34, pag. 823.

Casagrandi. *L'azione patogena dei blastomiceti.* Questi Annali, 1899, vol. IX, pag. 141.

— *Studi sul carbonchio ematico,* memoria VI. *L'immunità verso il carbonchio nei suoi rapporti col meccanismo della patogenesi dell'infezione.* Questi Annali, vol. XII, 1902, pag. 616.

De Giaxa. *Sulla sostanza ad azione locale del bacillo della tubercolosi.* Questi Annali, vol. X, pag. 191.

Fodor I. *Neuere Untersuchungen ueber die bakterientötende Wirkung des Blutes und ueber Immunisation.* Centralb. f. Bakt. (Orig.), 7, 1890, 753.

— *Ueber den Einfluss des Blutes auf die Milzbrandbacillen,* id. (Orig.), 2, 1887, 170.

— *Ueber die Alkalizität des Blutes und Infektion,* id. (Orig.), n 17, 1895, 224.

— *Untersuchungen ueber Alkalescenz des Blutes nach einer Infektion,* id. 16, 1894, 783, 822.

— *Zur Frage der Immunisation durch Alkalisation,* id. (Orig.), 10, 1891, 7.

Galeotti. *Sul potere vaccinante dei nucleo-proteidi estratti dagli organi immunizzati.* Morgagni, 1903, marzo, n. 3.

— *Beitrag zur Kenntniss der bacteriellen Nucleoproteide.* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, 1898, s. 49.

Lustig. *Immunità per le malattie da infezione.* Torino, 1897.

— Archivio di Fisiologia, 1904, f. III, pag, 337.

Lustig e Galeotti. Lo Sperimentale. Firenze, 1898.

Macfadyen and Rowland. *Upon the intracellular costituents of the tyfoid bacillus.* Centralblatt. f. Bakt. Originale, vol. XXX, 1901, pag. 753 vol: XXXIV, 1903, pag. 618, 765.

Maffucci. *Sui prodotti tossici del b. tubercolare.* Policlinico, vol. II, C. f. I.

Nencki. M. *Ueber das Eiweis der Milzbrandbacillen.* Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 17, 1884, s. 2605.

Oppenheimer. Die Bakteriengifte. (*Handbuch der pathogenen Mikrorganismen.* Kolle und. Wasserman, 1902, pag. 376).

Paladino-Blandini. *Tentativi di vaccinazione chimica anticarbonchiosa.* Riforma medica, anno XIX, n. 20.

Ruppel W. G. *Zur Chemie der Tuberkelbacillen.* Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 26, 1898, s. 218.

— *Die proteine.* Marburg. 1900.

Tiberti. *Sul potere immunizzante del nucleo–proteide estratto dal b. del carbonchio ematico.* Policlinico. Sez, pratica, f. X, 1902-1903.

— *Ueber die immunieserende Wirkung des aus dem Milzbrandbacillus extrahierten Nukleoproteids.* Centralblatt f. Bakt. Originale, vol. XXXV, 1904, f. 1.

— *Intorno al potere immunizzante del nucleoproteide estratto dal bacillo del carbonchio ematico.* Fasc. V, tomo LIX, 1905.

Vigorita. *Sul valore profilattico del nucleo-proteide del b. antracis.* Arch. intern. di medicina e chirurgia. Anno XIX. Lavori originali.

Weil. *Zur Chemie und Toxycologie des Tuberkelbacillus.* Deutsche medic. Wochenschr., 1891, s. 256.

OSPEDALE MILITARE DI ROMA

Sulla determinazione dell'umidità delle case col metodo delle malte

Nota del dottor G. B. MARIOTTI BIANCHI.

Da quando sono stato incaricato della direzione dei laboratori di quest'ospedale, mi è occorso assai frequentemente di occuparmi dell'abitabilità di fabbricati di nuova costruzione, essendomi stato richiesto dalle Superiori Autorità un parere tecnico sull'argomento, prima di decretare che i locali venissero occupati. Lasciati da parte i metodi che si basano sull'umidità dell'aria racchiusa negli ambienti, metodi sommamente fallaci, perchè troppo soggetti a cause d'errore d'ogni genere (influenza dell'umidità dell'aria esterna, della chiusura più o meno perfetta delle porte e finestre, della maggiore o minore permeabilità delle mura agli scambi gassosi, ecc.), mi sono attenuto esclusivamente al metodo di Glaessgen, colle modificazioni di Lehmann e Nüssbaum, il quale si basa su criteri molto più attendibili, e cioè sul dosaggio della umidità dei materiali che costituiscono le mura, e che viene indicato comunemente col nome di *metodo delle malte* (1).

Esso presenta certamente dei pregi che sarebbe vano ricercare nei metodi precedenti, anzi a prima vista sembra che il metodo stesso debba rispondere a tutte le esigenze. Tuttavia nella pratica esso presenta due difficoltà che è bene tener presenti, se non si vogliono commettere errori grossolani, difficoltà che si riferiscono alla scelta del materiale da esaminare e al fatto che ogni luogo ha materiali speciali

(1) Nella esecuzione dei dosaggi fui coadiuvato validamente dal cavaliere Bompiani, direttore della farmacia dell'Ospedale; a lui son lieto di poter porgere i più vivi ringraziamenti.

da costruzioni, dei quali varia enormemente il potere igroscopico. A mettere in evidenza tali cause di errore ho creduto non inutile riferire brevemente le mie osservazioni, le quali contribuiscono a stabilire esattamente i confini dell'abitabilità degli ambienti di nuova costruzione in Roma, per mezzo di un metodo il quale, ove sia bene adoperato, rende servigi davvero indiscutibili.

***

Il metodo, lo si sa, è molto semplice. Esso non richiede istrumenti complicati, ma un semplice trapano e un essiccatore. Il trapano migliore è quello comune a mano usato dai muratori (1), con due punte, una da scalpellino che serve per forare il muro fino alla profondita voluta, ed una a spirale, da falegname, ben temprata, la quale introdotta sulla guida del foro praticato, riduce il materiale in minuta polvere e lo fa uscire al di fuori. Questo vien raccolto in alberelli di vetro a tappo smerigliato essiccati antecedentemente alla stufa, per mezzo di un imbuto appiattito da un lato in modo da adattarsi alla parete. Esso del resto non è indispensabile, potendo essere sostituito da un semplice foglio di carta.

Eseguita la presa del materiale, si trasporta in laboratorio, si tritura ove occorra, e si essicca a 110° fino a perdita di peso (2) in apposite navicelle, calcolando così la percentuale di acqua contenutavi.

L'essiccazione esige delle speciali cautele. Una temperatura maggiore di 110° può liberare delle sostanze combinate e dare un per cento maggiore; una temperatura minore può non condurre all'essiccamento completo. Inoltre se noi facessimo l'essiccamento in una comune stufa a secco, dopo che il peso è diminuito fino ad un certo punto, resta per un momento stazionario e poi torna ad aumentare, perchè il materiale si combina all'acido carbonico dell'ambiente.

Per tutte queste ragioni il Casagrandi ha modificato il primitivo apparecchio di Lehmann e Nussbaum, in gran parte di vetro, riducendolo un apparecchio semplice, solido e perfettamente rispondente allo scopo, col quale la temperatura si mantiene a 110° facilmente, e il materiale trovasi esposto ad una corrente di un gas o di aria privati perfettamente della umidità e dell'acido carbonico coi mezzi consueti che si usano in chimica. Questo apparecchio, che noi ci siamo fatti costruire, funziona egregiamente, ed è quello col quale abbiamo eseguito i nostri dosaggi.

***

Nell'esecuzione del metodo le prime nostre cure debbono essere rivolte alla presa del materiale. Già Lehmann e Nussbaum avevano messo in evidenza le cause di errore che alla scelta del materiale si

---

(1) Esso sostituisce con vantaggio la trivella Tursini, ideata allo stesso scopo.

(2) Ho detto « fino a perdita di peso » e ritengo ciò preferibile ad un numero fisso di ore (4 ore secondo alcuni), perchè non bastano sempre 4 ore per avere un essiccamento completo.

riferiscono; essi fecero notare che a Monaco la pietra si asciuga molto più presto della malta, cosicchè quando noi facessimo un dosaggio sui frammenti di pietra, troveremmo cifre di acqua molto minori. Ciò, se vale per Monaco, non vale per altri luoghi, come vedremo in seguito; ma in ogni modo Lehman e Nussbaum vengono a concludere che bisogna prendere la malta delle commessure, superficiale e profonda, e come limite tollerabile assegnano l'1-1.50 %.

In Germania questa percentuale è stata in massima accettata, ed anche l'Abel, a parecchi anni di distanza (1903), ritiene che il limite tollerabile oscilli fra l'1, l'1-50 e il 2 %. Ma in Italia si sono osservate differenze notevoli fra regione e regione: così il De Rossi a Pisa stabilisce il limite di 1.50 %, il Coggi a Milano il 3 %, il Casagrandi a Roma il 2-3 %. Bisogna concludere quindi che *il metodo deve essere accettato solo in base a ricerche sistematiche stabilite in ciascuna località, non potendosi dare cifre generali.*

Ho appena accennato ai risultati ottenuti da coloro che precedettero il Casagrandi nelle sue esperienze, poichè tali ricerche sono riferite e discusse nel lavoro del Casagrandi medesimo (1); dopo di esso comparvero ancora due pubblicazioni sull'argomento che mi preme citare, una del De Rossi ed una del Santori, riferentisi ad osservazioni eseguite rispettivamente in Pisa ed in Roma.

Il De Rossi (2) si è preoccupato del potere igroscopico dei vari materiali da costruzione usati in Pisa, e con ripetuti dosaggi ha potuto stabilire che la malta è molto più ricca di acqua degli altri materiali, i mattoni ne sono più poveri, gli altri materiali infine risultano in genere poverissimi di acqua, eccezione fatta di un'arenaria che fu trovata contenere il 5.61 % di acqua, mentre la malta nelle stesse condizioni ne conteneva appena il 2.68 %.

Pare tuttavia che l'uso di questo materiale sia rarissimo in Pisa mentre gli altri materiali (macigno, calcare, ecc.), contengono quasi sempre frazioni d'acqua molto inferiori all'unità. L'autore ne deduce che « la determinazione dell'umidità della malta superficiale e profonda è sufficiente per la determinazione dell'abitabilità delle case nuove », e conferma per Pisa il limite massimo di 1.50 %.

Il Santori (3) ammette pure in genere come limite massimo per Roma il 3 %, ma ritiene che in alcune circostanze si possa tollerare anche il 3.50 %. Egli infatti in una casa di vecchia costruzione e asciuttissima ot-

(1) *Sui metodi per giudicare dell'abitabilità delle case vecchie e nuove dal grado di umidità degli ambienti.* Questi Annali, 1903.

(2) *Di alcuni nuovi metodi di determinazione dell'umidità delle mura.* Questi Annali, 1903.

(3) *Sulla attendibilità di alcuni mezzi messi in opera per l'accertamento dell'umidità delle case.* Questi Annali, 1904.

tenne un giorno cifre superiori al 3 %. Non si occupa del potere igroscopico dei vari materiali, parlando solo delle malte.

***

Dalle cifre e dati sopra riferiti emerge un fatto evidente, la *diversità di contenuto in acqua dei vari tipi di malte in uso nelle varie località:* così mentre per esempio, a Monaco e a Pisa non sarebbe tollerabile l'1.70 % a Roma e a Milano è tollerabile il 3 % e forse anche di più, come vedremo in appresso. Quanto ai varii materiali da costruzione, manca a Roma ogni ricerca in proposito, cosicchè non sappiamo qual sia il potere igroscopico di essi e quindi non conosciamo se sia assolutamente *necessario* e anche *sufficiente* dosare l'acqua contenuta nelle sole malte.

Tale ricerca sembrami del tutto indispensabile, perchè vi sono dei materiali sommamente igroscopici: la qual cosa fu già messa in luce dal Tursini nel 1891, quando in case vecchie aveva trovato che il tufo conteneva anche l'8 % di acqua. Ora il conoscere il coefficiente igroscopico di ciascun materiale può guidarci nella preparazione dei campioni e quindi evitarci errori notevoli.

Se noi prendiamo dal muro del materiale, *qualunque esso sia*, infiggendo il trapano dovunque capiti, osserviamo differenze notevolissime da campione a campione. In un fabbricato costruito in dicembre 1902, il 3 agosto 1903, cioè 8 mesi dopo, ottenevo i seguenti risultati:

TABELLA 1.

Numero d'ordine	Piano	Esposizione del muro	Situazione del muro	Acqua %
1	1° piano	N	Esterno	5.13
2	Id.	W	Id.	8.55
3	Id.	E	Id.	12.20
4	Id.	S	Id.	9.65
5	2° piano	E	Id.	8.28
6	Id.	W	Interno	4.26
7	Id.	W	Esterno	8.72
8	Id.	N	Id.	9.33

Come poter paragonare fra loro sì diverse cifre e trarne un criterio scientifico? E' quindi evidente che per dare un giudizio *conviene tener conto del materiale preso in esame.*

Le *malte*, alle quali va prima di tutto rivolta la nostra attenzione, hanno costituzione diversa a seconda dei casi, diversissima nei vari luoghi. Quasi dappertutto si usa mescolare la calce spenta, in quantità maggiore o minore, all'arena. In Roma invece entra un elemento speciale nella costituzione della malta, la pozzolana, materiale ideale per tale scopo, ma che ha un coefficiente di igroscopia molto maggiore dell'arena. Inoltre la malta ottenuta è tenacissima, condizioni queste che spiegano come a Roma le malte diano cifre d'acqua sempre molto superiori che altrove.

Da ripetuti dosaggi da me praticati a varia distanza dalla costruzione di cinque o sei fabbricati che ho dovuto studiare, ho ottenuto i risultati seguenti.

TABELLA 2.

Malte.

Numero d'ordine	DISTANZA dalla costruzione del fabbricato	Piano	Esposizione del muro	Situazione del muro	Acqua %
1	Quindici giorni.	Terreno	..	..	15.63
2	Dieci mesi	1° piano	W	Esterno	7.59
3	Id.	2° piano	E	Id.	8 50
4	Undici mesi.	Terreno	..	Interno	10.33
5	Un anno	Id.	..	Id.	17.48
6	Id.	2° piano	SE	Esterno	7.14
7	Id.	1° piano	..	Interno	4.32
8	Id.	Id.	..	Id.	7.11
9	Tredici mesi.	Terreno	SW	Esterno	7.42
10	Quindici mesi	1° piano	W	Id.	4.20
11	Diciotto mesi	Terreno	..	Interno	8.60
12	Quattordici anni	2° piano	W	Esterno	3.48
13	Id.	Id.	S	Id.	4.64
14	Id.	1° piano	W	Id.	4.24

Risulta chiaramente come ***entrino in giuoco fattori diversi nel prosciugamento delle mura***: così l'essere il muro interno od esterno, più o meno bene esposto, al piano terreno o ai piani superiori influiscono sulla maggiore o minore rapidità colla quale il muro si asciuga. Tuttavia, dopo un anno e mezzo le cifre si abbassano in modo notevole, tanto da avvicinarsi al grado tollerabile. Ma ciò che di più interessante emerge dallo specchietto sopra riportato vien rappresentato dagli ultimi tre dosaggi. Ho scelto a tale scopo uno dei padiglioni dell'Ospedale Militare, costruito da circa 14 anni, in posizione elevata, bene esposto ed avente tutti i caratteri di una perfetta secchezza. Per di più i campioni vennero prelevati in piena estate, in giornate calde ed asciutte (1).

Orbene la percentuale di acqua oscillò fra 3.48 % e 4.64 %, il che avrebbe portato senz'altro ad un giudizio di assoluta inabitabilità. Può ammettersi ciò in un ospedale che da anni è stato sempre ritenuto uno dei migliori tipi, rappresentante ciò che di meglio ha dato l'igiene ospitaliera? Evidentemente no: e noi dobbiamo ammettere che una umidità del 3 % nelle malte di Roma è ancora assai bassa, e quale limite tollerabile dobbiamo anche ritenere cifre del 4-4.60 %, a meno di non volere negare a mezza Roma il permesso di abitabilità.

Ma è poi sufficiente rivolgere la nostra attenzione alla malta soltanto? A questo quesito, al quale il De-Rossi risponde per Pisa molto giustamente in modo affermativo, è necessario dare una soluzione qui in Roma dove viene usato su larga scala un materiale affatto speciale, *il tufo della campagna romana.*

E' questo un materiale buonissimo da costruzione: ma è dotato di un potere igroscopico molto elevato, analogamente a quello di Napoli, cosicchè, nel momento in cui viene usato, può giungere a contenere fino al 18 per cento di acqua.

Ciò è dovuto principalmente al fatto che al momento della costruzione il tufo viene abbondantemente bagnato.

Vi sono poi delle varietà che è bene conoscere: il più comune è il così detto tufo rosso, al quale deve perciò rivolgersi principalmente la nostra attenzione.

Molto più raramente si incontrano pezzi di un tufo biancastro o nerastro, detti rispettivamente tufo bianco e nero. Di queste tre varietà il tufo bianco è molto meno igroscopico, il nero lo è più di tutti, ed il rosso in grado minore di quest'ultimo, ma a poca distanza da esso.

---

(1) Questa precauzione, di scegliere cioè tempi sereni ed asciutti pel prelevamento dei campioni, è stata da me osservata per tutti i dosaggi.

Dai dosaggi che ho praticati, risulta che *l'essiccazione di questo materiale si fa in modo assai lento,* e tale che la casa dovrebbe dirsi ancora inabitabile quando la malta dà cifre tollerabili. Inoltre pel tufo si ottengono cifre oscillanti ampiamente, e tali oscillazioni, le quali spesso conducono a risultati apparentemente contraddittori, non possono spiegarsi che con una variabilità estrema nel grado di compattezza del tufo, e forse anche dipendono da una maggiore o minore bagnatura all'atto della costruzione.

TABELLA 3.

Tufo.

Numero d'ordine	DISTANZA dalla costruzione del fabbricato	Piano	Esposizione del muro	Situazione del muro	Acqua %	*Osservazioni*
1	Sette mesi. . . .	2° piano	W	Esterno	16. 48	
2	Id. . . .	1° piano	W	Id.	4. 54	Tufo bianco.
3	Un anno.	Id.	..	Interno	4. 63	
4	Id. . . .	Id.	..	Id.	4. 25	
5	Id. . . .	Id.	..	Id.	7. 69	
6	Id. . . .	2° piano	..	Id.	5. 98	
7	Id. . . .	Id.	..	Id.	6. 58	
8	Tredici mesi . . .	Terreno	..	Id.	12. 49	Tufo nero.
9	Id. . . .	Id.	NE	Sotto il portico	6. 36	
10	Id. . . .	Id.	..	Interno	14.64	Tufo nero.
11	Quindici mesi. . .	1° piano	..	Id.	5. 44	
12	Id. . . .	Id.	E	Esterno	11. 78	
13	Id. . . .	2° piano	E	Id.	10. 14	
14	Id. . . .	Id.	..	Interno	10. 56	
15	Sedici mesi. . . .	1° piano	W	Esterno	13. 28	Tufo nero.

Numero d'ordine	DISTANZA dalla costruzione del fabbricato	Piano	Esposizione del muro	Situazione del muro	Acqua %	Osservazioni
16	Sedici mesi . . .	2° piano	..	Interno	4.76	
17	Diciotto mesi. . .	Terreno	..	Id.	11.96	
18	Diciannove mesi. .	Id.	..	Id.	10.80	
19	Id. . . .	Id.	..	Id.	13.44	Tufo nero.
20	Id. . . .	Id.	..	Id.	15.16	Id.
21	Due anni e mezzo..	1° piano	..	Id.	6.70	
22	Id. . . .	Id.	W	Esterno	5.60	
23	Quattordici anni. .	Id.	W	Id.	5.48	
24	Id. . . .	Id.	W	Id.	5.12	
25	Id. . . .	Id.	W	Id.	4.79	
26	Id. . . .	Id.	W	Id.	5.08	

Dai dosaggi che ho praticato risulta che, facendo astrazione dal tufo nero, il quale dà cifre elevatissime anche dopo 19 mesi, e tenendo calcolo delle amplissime oscillazioni proprie del tufo, solo dopo il secondo anno dalla costruzione si ottengono cifre che si avvicinano a un grado tollerabile. Ma anche qui il fatto più interessante parmi sia quello messo in luce dagli ultimi quattro dosaggi. Non ho che a ripetere quanto ho detto per le malte: *un fabbricato costruito da quattordici anni, esposto ad ovest, di estate, in ottime condizioni di secchezza, dà pel tufo cifre oscillanti dal 4.79 al 5.50* %, le quali sono ben lontane dal] 3 % che finora veniva ammesso in Roma come limite tollerabile.

Pei *mattoni* la cosa è molto diversa. Essi contengono, in genere, pochissima acqua, anche al momento della costruzione, si asciugano anche molto più presto, e non raggiungono mai il 3 %. Anche per essi è da rilevare tuttavia che vi sono differenze sensibili: vi sono i mattoni delle fornaci dei dintorni di Roma, quelli di Pescara, quelli di altre provenienze, i quali hanno un diverso potere igroscopico.

Inoltre vi è un altro elemento che influisce su tale potere, ed è la cottura: i mattoni molto cotti contengono meno acqua di quelli poco cotti, poichè quando vengono bagnati per l'uso, i primi, più duri e compatti, assorbono molto meno acqua dei secondi.

In ogni modo il mattone contiene sempre una percentuale di acqua molto minore delle malte e del tufo, come è dimostrato dalle cifre seguenti:

TABELLA 4.

Mattoni.

Numero d'ordine	DISTANZA dalla costruzione del fabbricato	Piano	Esposizione del muro	Situazione del muro	Acqua %	Osservazioni
1	Quindici giorni. . .	Terreno	..	..	1.43	
2	Id. . . .	Id.	..	..	0.65	
3	Nove mesi	1° piano	W	Esterno	0.20	
4	Undici mesi. . . .	Terreno	NE	Id.	2.80	Con poca malta.
5	Un anno	1° piano	S	Id.	2.40	Id.
6	Id. . . .	Terreno	SE	Id.	1.08	
7	Id. . . .	1° piano	NE	Id.	0.73	
8	Quindici mesi . . .	2° piano	W	Id.	1.84	
9	Sedici mesi	Id.	W	Id.	0.80	
10	Id. . . .	Id.	E	Id.	1.36	
11	Diciotto mesi . . .	Terreno	N	Id.	1.60	
12	Id. . . .	Id.	E	Id.	2 04	Con poca malta.
13	Quattordici anni . .	1° piano	W	Id.	0.35	
14	Id. . . .	Id.	Id.	Id.	0.37	

Come si vede, *il mattone contiene sempre quantità d'acqua molto basse*, che non superano mai il 2 %. Il coefficiente normale di umidità, quello stabile cioè, che si trova dopo raggiunta la completa secchezza, è rappresentato da cifre oscillanti fra 0.30 e 0.40 %.

***

Esaminati così partitamente i materiali in uso qui in Roma, resta a vedere se potrebbero ottenersi risultati soddisfacenti prendendo dei miscugli di varia costituzione. Su ciò ho fatto moltissime ricerche, ma

come era facile supporre, i risultati non furono soddisfacenti. Gli stessi fabbricati che per umidità trovata nella malta o nel tufo dovrebbero dirsi inabitabili, sarebbero invece abitabili, dosando l'acqua con dei miscugli, purchè in questi vi sia un po' di mattone. Viceversa dove questo manca le cifre sono di solito molto elevate.

Cosicchè non è possibile ricavare dati attendibili dalla trapanazione di un muro, quando con questo mezzo vengano estratti i materiali da costruzione, comunque costituiti, sì da aversi dei miscugli, i quali sono estremamente variabili per costituzione e per i rapporti scambievoli di quantità fra i tre principali materiali prima studiati.

A questa conclusione sono giunto dopo ben 48 dosaggi, che stimo inutile riferire.

***

Le conclusioni che possono trarsi dalla lunga serie di osservazioni sopra riportate mi sembra non manchino di un notevole interesse pratico; esse possono riassumersi nelle seguenti proposizioni:

1° I materiali da costruzione usati in Roma sono principalmente il tufo, il mattone e la malta, costituita a base di calce e pozzolana.

2° Di questi tre materiali il mattone contiene sempre, anche a brevissima distanza dalla costruzione, una quantità di acqua molto bassa, inferiore alle cifre stabilite come limite tollerabile dai vari autori. La percentuale di acqua va col tempo gradatamente scemando, fino a ridursi a una frazione dell'unità.

3° La malta, molto ricca di acqua al momento della costruzione (oltre il 15 %), si essicca assai lentamente: in modo approssimativo, e tenendo conto di tutte le circostanze favorevoli o sfavorevoli nei singoli casi, può ritenersi che solo dopo oltrepassato un anno e mezzo dalla costruzione del fabbricato, le malte comincino a dare cifre tollerabili.

4° Il tufo è anche più igroscopico delle malte, fatta eccezione pel così detto tufo bianco, assai raro. Appena costruito il fabbricato, il tufo può contenere sino al 18 % di acqua; la sua essiccazione si fa anche più lentamente che quella della malta, cosicchè può dirsi approssimativamente che solo dopo il secondo anno dalla costruzione, il contenuto in acqua diventi tollerabile.

5° Ottenuto l'essiccamento completo, come si può avere in buoni fabbricati dopo molti anni dalla costruzione, si ottiene quello che volentieri chiamerei *coefficiente normale di umidità*. Esso pel tufo si è visto variare da 4. 79 a 5. 48 %, e per le malte da 4. 24 a 4. 64 %.

Queste cifre debbono essere prese come base di giudizio per Roma, anzichè il 3 % finora accettato, essendo questa cifra assolutamente scarsa, data la speciale costituzione dei materiali qui in uso.

6° Infine risulta evidente dalle mie osservazioni che a Roma bisogna eseguire le prese dei campioni in modo speciale, essendo insufficiente rivolgere l'attenzione alle malte. Occorre invece dosare esattamente l'umidità delle malte e del tufo, prendendo separatamente numerosi saggi delle une e dell'altro; e solo quando il fabbricato è costruito di soli mattoni ci contenteremo delle malte.

Tutti questi materiali devono prendersi dopo aver tolto dal muro l'intonaco. Questo, come un sottile strato superficiale, rapidamente si asciuga e rapidamente assume nuova acqua dall'ambiente, quando l'aria è ricca di umidità.

Il comprenderlo quindi nei campioni non sarebbe che causa di errori in un senso o nell'altro.

Tolto l'intonaco si procederà alla prese dei campioni, tenendo presente che è necessario giungere presso a poco al centro del muro (1).

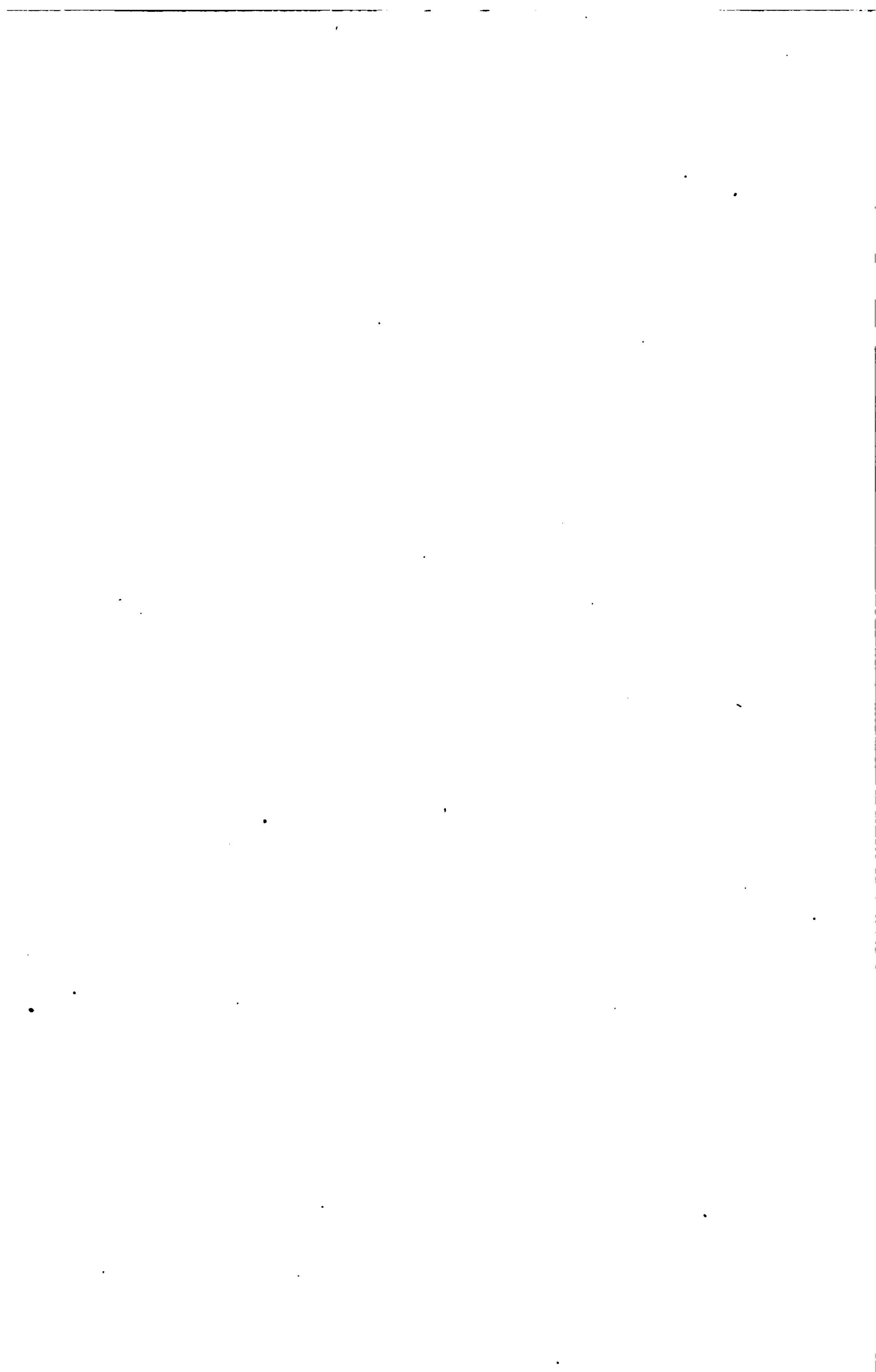
Roma, agosto 1905.

---

(1) La presente nota era già consegnata, quando usciva l'interessante lavoro del dottor Maione pubblicato in questi Annali, 1905, ricco di osservazioni importanti e degne di attenzione.

Così giustissima trovo l'ipotesi che molti degli errori fin qui commessi dipendano dall'essiccazione, non mai fatta fino a costanza di peso. Ma ciò che di più interessante rilevasi nella memoria del Maione è la distinzione che egli fa dell'acqua di imbibizione o igroscopica dall'acqua di combinazione; quest'ultima che non evapora che ad alte temperatura (100°-110°), dovrebbe, secondo l'Autore, essere trascurata affatto nel giudizio sull'umidità di un fabbricato. Propone quindi l'essiccamento a 50° fino a perdita di peso.

Teoricamente ciò è senza dubbio giustissimo, tuttavia in pratica possiamo benissimo usare l'essiccazione a 110°. Infatti la quantità dell'acqua di combinazione oscilla, a detta dello stesso Autore, fra l'1 e l'1.50 % nella malta e nel tufo; rappresenta quindi un valore costante che non può essere causa di errori. Tutto al più nel caso in cui si trovino quantità di acqua vicine ai limiti tollerabili, si potrebbe oltre l'acqua totale, dosare l'acqua di imbibizione; di solito ciò non sarà necessario. Sarebbe invece necessario, se oltre al tufo ed alla malta ci si dovesse occupare anche di altri materiali che contengono quantità variabili di acqua di combinazione. Qui in Roma però non è il caso di parlarne, giacchè è sufficiente rivolgere la nostra attenzione alla malta ed al tufo, come ho cercato di dimostrare.



Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Studi sul vaccino

per il prof. O. CASAGRANDI

Sommario. — Filtrabilità del virus — Resistenza del virus ad alcuni agenti fisici e chimici — Caratteri microscopici del germe del vaccino.

Nel 1903, quando le ricerche sul modo di comportarsi del virus vaccinico filtrato attraverso le candele che trattengono i comuni batteri, avevano persuaso i vari studiosi che il virus rimaneva sulle candele, nell'Istituto d'Igiene della R. Università di Roma, iniziai una serie di esperienze, filtrando polpa vaccinica attiva, pressata a 300-500 atmosfere, attraverso materiali a pori finissimi che non lasciavano assolutamente passare alcun batterio. Queste ricerche comunicai in una nota dal titolo, *Studi sul vaccino*, pubblicata nel n. 31 della *Riforma Medica* dello stesso anno. A questa nota, dopo l'intervallo di vari mesi, tenne poi dietro una serie di comunicazioni alla Società dei Cultori delle scienze mediche e naturali di Cagliari, fatte nelle sedute del 17 giugno 1904, del 25 marzo, del 7 aprile, del 20 maggio e del 28 giugno del 1905 (1).

Coloro che per essermi stati vicini nel 1903 conoscono le condizioni peculiari, nelle quali io allora iniziai e condussi le mie ricerche, non possono non avere la persuasione che sino da allora mi ero convinto della filtrabilità del virus. Io presi e continuai a lavorare sull'argomento mentre il mio amato Maestro, professor Celli, riteneva che il germe del vaccino fosse così grosso, da non passare attraverso i filtri che si lasciano attraversare dai comuni batteri, e mentre il collega Santori F. aveva trovato i filtrati

(1) I resoconti di queste comunicazioni sono riportati nel giornale *Il Policlinico*, sezione pratica, nei fascicoli seguenti: 33 del 1904, 11 (la data della comunicazione è nel fasc. 17), 20, 23 e 33 del 1905.

ottenuti attraverso le candele di calcare siracusano, da me fornitogli, e le piccole Kitasato, che avevo nell'Istituto, assolutamente inattivi sulla cute delle vitelle e dell'uomo e successivamente mi riferiva che i miei primi filtrati, attraverso le Berkefeld comuni, si diportavano sull'uomo come gli altri.

E continuai, nonostante questi risultati poco confortanti, a lavorare sull'argomento, perchè dopo aver trovato, che « la polpa vaccinica con la quale si possono ottenere pustole sulla cute dei cani e la reazione del Guarneri sulle cornee dei conigli, se attraversa adatti materiali porosi che non lasciano passare germi visibili, diventa incapace di produrre l'uno e l'altro fatto »; ne traevo anche questa considerazione che « se il filtrato rimaneva inattivo sulla cute dei cani e sulla cornea dei conigli, non si poteva, a rigore escludere che esso contenesse il germe del vaccino; si poteva soltanto affermare che esso non conteneva l'agente causale della pustola vaccinica, ecc. ».

Così è che, nonostante le risultanze delle ricerche del Santori F., mi persuasi che la questione era ancora tutta aperta e che per risolverla, non rimaneva che ricorrere a prove indirette. Queste le eseguii su quattro cani e poichè mi portarono a concludere che « i cani inoculati sulla cute con filtrato di vaccino attivo, pressato, batteriologicamente sterile, si immunizzano verso ripetute inoculazioni di vaccino attivo, mentre quelli inoculati col filtrato di vaccino inattivo non si immunizzano », credetti di avere in mano la prova del passaggio del virus nel filtrato. Difatti quando riuscii ad ottenere sulla cute dei cani delle pustole indifferenziabili da quelle vacciniche, emulsionando nei filtrati uno stafilococco aureo isolato dal vaccino, scrissi « ciò parlerebbe in favore dell'intervento nella fase suppurativa della reazione vaccinica cutanea di un piogeno speciale, che troverebbe le condizioni favorevoli al suo sviluppo nella lesione cutanea provocata dal germe del vaccino ». Il che in altri termini che cosa poteva significare, se non che io ammettevo si trovasse il germe del vaccino, nel filtrato, in cui avevo emulsionato lo stafilococco? Trattandosi poi di filtrati sterili, amicrobici, certamente non poteva concepire che il virus vaccinico vi si trovasse altro che in uno stadio di invisibilità! Non bisogna dimenticare che nel contesto del lavoro ho anche scritto che i filtrati all'esame microscopico si dimostravano non contenere « alcun corpo per quanto piccolo ».

E nell'auto-riassunto pubblicato negli *Auto-riassunti* e riviste dei lavori italiani, ecc. (Vol. I, n. VIII - Parma, 1903) scrissi che gli esperimenti fatti mi portavano a ritenere, « con le debite riserve, che la filtrazione abbia lasciato passare i germi del vaccino, e che la produzione delle pustole sia dovuta alla presenza di altro germe, il quale troverebbe le condizioni che ne permettono lo sviluppo nelle lesioni cutanee provocate dal germe del vaccino ».

E fu sempre nella convinzione di avere, per mezzo della prova immunizzante, dimostrato che il virus vaccinico era passato nel filtrato, che nel trattato di Batteriologia che fa parte del *Manuale dell'igienista*, edito dalla Società Dante Alighieri e venuto in luce nel 1903, sebbene porti la data del 1904, nel capitolo dei « germi invisibili od ultra microscopici » collocai la prova da me fatta tra quelle da mettersi in opera per vedere se nei filtrati si trovino appunto esseri in uno stadio di invisibilità. Scrissi

infatti allora (pag. 471): « sinora si è ritenuto che nel liquido privo di germi visibili si debba ammettere la presenza di germi invisibili, quando con esso si riescono a riprodurre le lesioni e i sintomi che si osservano nella malattia.... Però io sono d'avviso che questa dimostrazione diretta possa venire a mancare in quelle malattie in cui le lesioni microscopiche e macroscopiche che si osservano e che si considerano come caratteristiche, sono dovute a germi intervenuti secondariamente e accompagnanti sempre il virus. Questa conclusione ricavo dai miei studi sul vaccino... Quindi io credo che *quando col filtrato non si riesce ad ottenere la produzione di alcuna lesione che caratterizzi la malattia, rimane sempre da vedere se l'animale sia rimasto immunizzato con lo stesso filtrato* ».

Successivamente, nell'Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari, dal dicembre 1904 a tutto il corrente anno 1905, non ho più abbandonato lo studio della quistione. Così ben presto *perfezionando la tecnica della triturazione*, mi sono persuaso che il virus passava non solo attraverso le piccole comuni Berkefeld, ma attraverso tutte le grandi e piccole Berkefeld *V*, *N*, *W*, Chamberland *F*, Silberschmidt aiutando la filtrazione con una pressione negativa corrispondente al massimo a 760 mm. di Hg.

Comunicai queste mie ricerche, nella seduta del 25 marzo 1905 della Società dei Cultori delle scienze mediche e naturali di Cagliari, seduta che, come risulta da dichiarazione scritta dalla Presidenza, per cause indipendenti dai Soci comunicanti, fu rimandata dal 15 al 25 marzo.

Sempre continuando a perfezionare *la tecnica della triturazione*, potei ancora, nella seduta del 20 maggio, riferire di aver fatto esperimenti dimostranti che il virus poteva passare ancora attraverso le Chamberland *B* e le Kitasato, ossia attraverso candele che trattengono quasi tutti i germi invisibili e che le esperienze precedenti mi avevano persuaso trattenessero anche il virus vaccinico.

Intanto, dacchè quasi costantemente o nelle pustole vacciniche o nei filtrati di polpa vaccinica, capaci di dare la pustolosi cutanea, riuscivo ad isolare un piccolo cocco piogeno aureo, ciò che avevo sospettato dapprima, mi parve rispondere alla realtà dei fatti; ossia, che un piogeno speciale dovesse aver un rapporto con l'etiologia della pustola vaccinica, e questo anche indipendentemente dalle risultanze del lavoro del Sanfelice e del Malato, i quali con un micrococco aureo, morfologicamente identico ad uno stafilococco aureo, riprodussero la pustola vaiolosa nei cani e sospettarono che una forma analoga, ma incoltivabile dal vaccino ordinario, fosse l'agente causale della infezione vaccinica.

Ciò premesso, mi si conceda ricordare che le mie ricerche sull'etiologia del vaccino, riflettenti la dimostrazione dell'agente di esso nei filtrati, assolutamente amicrobici, nel più stretto senso batteriologico, e, attraverso candele che dànno garanzia di non lasciare passare germi visibili, non sono precedute da quelle di alcun altro. L'unica osservazione che potrebbe mettersi avanti alla mia, per esser stata eseguita con un filtrato ottenuto attraverso candele che rispondono al quesito di trattenere i comuni batteri, sarebbe

quella del Siegel (1) che avrebbe trovato attivo il virus vaccinico passato attraverso le Chamberland *F*. Ma le ricerche dell'A. sono, state fatte, se non erro, con un filtrato ottenuto alla pressione di molte atmosfere e l'A. non che di germi invisibili, parla di corpi mobili (lunghi $\frac{1}{2}$·1 μ e larghi $^1/_{10}$ di μ), che egli ritenne gli agenti dell'infezione vaccinica.

Altre ricerche sulla filtrabilità del virus vaccinico, sono poi state fatte con filtrati ottenuti attraverso candele Berkefeld, tra le più porose delle tre marche che sono in commercio, le *V*, le quali non dànno, per quanto mi risulta, molto affidamento di non lasciar passare i germi visibili. Vanno citate quelle del Negri (2) e quelle del Remlinger e Osman Nouri (3) per la positività dei loro risultati, dacchè i filtrati ottenuti da questi autori avrebbero riprodotta la pustola vaccinica, particolarmente quelli del Negri, da cui risulterebbe anche la possibilità di ottenere il fenomeno di Guarnieri nella cornea del coniglio. inoculata con questi filtrati.

Anche il Rouget (4) avrebbe ottenuto delle pustole identiche alle vacciniche, ma con un piccolo cocco isolato precisamente da filtrati di vaccino, ottenuti attraverso le Berkefeld *V*!

Ed ora chiedo venia al lettore se mi sono indotto a scrivere questa introduzione storica, dirò così, personale. Si è che dopo avere iniziato un lavoro nelle condizioni in cui lo iniziai io, e dopo averlo proseguito, persuaso di essere sulla buona strada, senza lasciarmi fuorviare da esperimenti negativi i cui risultati pure rispondevano a quelli ottenuti da tutti gli autori che mi avevano preceduto, dopo avere corretta e completata la tecnica in modo da rendere persino possibile il passaggio del virus attraverso le Chamberland *B* e le Kitasato, vedrei ancora con dolore non venisse riconosciuta l'opera mia per quanto modesta essa sia.

I.

Materiale usato per le ricerche.

Il materiale per le ricerche eseguite nel 1903 mi fu tutto cortesemente fornito dal professor Leoni, già direttore del vaccinogeno dello Stato. Si trattò di vaccino appena ricavato dalle vitelle, ridotto più o meno in poltiglia, come ordinariamente si fa nella pratica. Lo stesso prof. Leoni mi

---

(1) *Unters. ü. d. Aetiologie d. Poken u. d. Maul- und Klauenseuche.* Kgl. preussichen Akademie d. Wissenschaften. Berlin, 1905. Ref. Münch. med. Woch., 9 Mai 1905.

(2) *Esperienze sulla filtrazione del virus vaccinico.* — Gazzetta medica italiana. Pavia, n. 13, 30 marzo 1905.

(3) C. R. de la Soc. de Biologie, 27 maggio e 17 giugno 1905.

(4) C. R. de la Soc. de Biologie, 10 giugno 1905.

fornì anche vaccino pronto per esser messo in commercio, tutte le volte che mi occorse di avere bisogno di vaccino attivo ben depurato, nonchè, per alcune esperienze di controllo, del vaccino ben conservato ma inattivo, perchè di vari anni.

Le raccolte di vaccino bovino provenienti dall'Istituto vaccinogeno Leoni, le quali mi servirono per le ricerche che ritenni più importanti, ho denominato: vaccino Leoni I e vaccino Leoni II; esse rimontano alle date reciproche del 21 marzo e del 7 maggio 1903.

Alla fine di questo anno, grazie alla cortesia del prof. Gualdi, Ufficiale sanitario del comune di Roma, potei anche ottenere del materiale che egli raschiò da vitelle, in mia presenza. Chiamo questo vaccino Gualdi I e II.

Il vaccino che usai nelle esperienze del 1904 e del 1905, infine, lo debbo in gran parte alla cortesia del dott. Brotzu, Ufficiale sanitario di Cagliari. E' vaccino dell'Istituto vaccinogeno di Pavia. Chiamo questo vaccino Pavia. Debbo però aggiungere che ancora potei servirmi di qualche tubetto di vaccino dell'Istituto vaccinogeno Leoni.

Inoltre, dacchè avevo assodato che i cani, specie se giovani, sono molto recettivi all'infezione vaccinica, ho a varii intervalli innestato vaccino bovino sulla cute di questi animali e fatte delle raccolte di vaccino canino più o meno abbondanti: ho denominato questo vaccino canino I, II, III, IV, V, VI corrispondente alle date 20 dicembre 1904, 17 gennaio, 22 febbraio e 1º marzo, 14 marzo, 7 marzo, 5 giugno 1905. I vaccini che ho ricavato da altre raccolte, non ho denominati.

II.

Tecnica seguita per rendere la polpa vaccinica filtrabile.

Le prime filtrazioni della polpa vaccinica così come trovasi in commercio, diluita in glicerina a $^1/_2$ concentrazione, mi condussero a trovare filtrati privi di qualunque azione, pur avendo, in un mortaio di porcellana, ridotto in poltiglia, la polpa vaccinica. Pensai quindi di ricorrere ad una tecnica che mi desse una certa garanzia di poter liberare il virus vaccinico dagli elementi cellulari. E poichè l'Istituto d'Igiene della R. Università di Roma, dove avevo incominciato queste ricerche, era fornito di una pressa Buchner, pressai la polpa vaccinica e filtrai il liquido ottenuto dalla spremitura.

A tal uopo, la polpa vaccinica veniva pestata in un mortaio di ferro insieme a farina fossile, colla quale si formava un piccolo pane, che avvolto in tela robustissima, si pressava. Naturalmente per rendere più facile la fattura del pane, si aggiungeva al materiale la quantità necessaria di glicerina pure neutra, diluita a metà con acqua distillata, sebbene non sempre sia stato necessario ricorrere a questa modalità di tecnica.

La pressione cui si sottoponeva il materiale, dapprima si fece giungere sino a 300 atmosfere, poi sino a 400 e anche a 500 e sopra ogni pane veniva ripetuta almeno per due volte di seguito allo scopo di poter ricavare la maggiore quantità possibile di liquido.

Appena raccolto il materiale in adatti recipientini sterilizzati, questi, venivano chiusi con tappo di ovatta sterile e posti in un refrigerante a corrente continua di acqua Marcia.

In seguito, nell'Istituto d'Igiene di Cagliari, cercai di perfezionare la tecnica, specialmente per quanto si riferiva alla triturazione del materiale. Nel dicembre del 1904 sottoposi infatti del pus vaccinico alla triturazione, non più insieme a farina fossile, ma a quarzo chimicamente puro che ebbi dalla cortesia del collega prof. Centanni.

Piccole porzioni di polpa vaccinica, venivano accuratamente triturate in mortaio di porcellana rugosa, sino a ridurla a una fina poltiglia, aggiungendo ogni tanto qualche goccia di glicerina al liquido. La pasta ottenuta si passava a piccole porzioni in un mortaio d'agata e si continuava la triturazione più o meno a lungo, dacchè con prove di controllo mi ero bene accertato che la triturazione, condotta in questo modo, può benissimo continuare per ore, senza che il virus venga danneggiato nella sua attività.

Il materiale ridotto così a polvere impalpabile, veniva allungato in acqua salata (Na Cl al 0. 85 %) o glicerina diluita con acqua salata e filtrata attraverso le candele.

Persuaso così che bene triturando il vaccino se ne facilitava il passaggio attraverso le candele, alla triturazione in mortaio di porcellana e di agata, aggiunsi quella in un mortaio di acciaio (press'a poco sul modello di uno ideato dal Sanfelice) il cui pestello, mobile intorno al proprio asse, poteva farsi girare con una manovella, ciò che rendeva possibile continuare a lungo la triturazione senza stancarsi.

Il materiale si toglieva dal mortaio diluendolo in Na Cl al 0. 85 % e il pestello vi si lavava a mezzo di uno spazzolino sterilizzato.

Il liquido così ottenuto, in cui minutissime particelle di ferro e di quarzo si trovavano in sospensione, veniva quindi filtrato.

***

Frattanto mentre andavo perfezionando la tecnica della triturazione, andavo anche perfezionando quella riflettente il mezzo col quale diluire il virus.

Senza tornare sulle ricerche già fatte da altri, più o meno ribadenti quelle del Leoni (1), gli è certo che la glicerina pura o appena diluita si sarebbe presentata come il migliore veicolo del virus. Senonchè la difficoltà di ottenere da una polpa vaccinica diluita in glicerina e concentrata o quasi, un materiale, che passasse in pochi minuti attraverso le candele, specie le Berkefeld *W* e le Chamberland, mi decise a sostituirla con glicerina sempre più diluita con Na Cl al 0. 85 % e poi addirittura con la sola acqua salata.

Soltanto, quando volli mantenere a lungo un filtrato, lo feci pervenire nel recipiente di raccolta, dopo che in quest'ultimo avevo posto in precedenza una certa quantità di glicerina pura, sterilizzata, s'intende.

---

(1) Sulla scoperta del modo di rendere batteriologicamente puro il vaccino animale, ecc. *Rivista igiene e sanità pubblica*, 1896.

***

Quanto alle candele adoperate per filtrare il virus vaccinico, sono state per ordine di studio candele di pietra calcarea siracusana, Kitasato, Berkefeld comuni piccole, Berkefeld grandi e piccole comuni, *V*, *N*, *W*, Silberschmidt, Chamberland *F* e *B*, Maassen.

Le candele di pietra calcarea siracusana fornitemi nel 1903 dall'ing. Cavallari di Catania furono, parte dallo stesso e da me opportunamente foggiate a mo' delle Maassen, parte da me a mo' delle Kitasato. Queste candele erano di 6 specie, ognuna a diversa porosità: tre di esse, vennero particolarmente sperimentate dal Santori F.

Le Berkefeld comuni piccole, vennero, dietro mia richiesta, inviate all'Istituto d'Igiene di Roma: le grandi comuni vennero inviate all'Istituto di Igiene di Cagliari insieme alle piccole e grandi *N*, *V*, *W*.

Lo stesso si dica delle Chamberland *F* e *B*, delle Kitasato, delle Maassen e delle Silberschmidt, salvo di due, nuove, che mi fornì cortesemente il dott. De Blasi.

Le candele prima di adoperarle, venivano bene scelte. Perciò si introducevano in un bagno di acqua distillata, e trascorso il tempo sufficiente perchè se ne fossero impregnate, veniva dentro di esse insufflata dell'aria per mezzo di una doppia pera di gomma o di una pera Centanni, sia che si trattasse di candele con collare, come le Berkefeld e Chamberland, sia senza, come le altre: solo, naturalmente, por accordare il tubo di gomma della pompetta a queste ultime, si usavano piccoli artifizi di tecnica, sui quali è inutile spendere parola.

All'atto pratico si notò che le Chamberland lasciavano fuoriuscire bolle d'aria solo nel punto corrispondente alla marca e le piccole Berkefeld sempre all'innesto del cappuccetto, mentre le altre candele, salvo qualche eccezione, si mostrarono incapaci di lasciare fuoriuscire bolle d'aria da qualsiasi punto. Corressi il difetto delle due prime candele coprendo la marca delle Chamberland e l'orlo del cappuccetto delle Berkefeld con mastice Archanson caldo, dopo avere alquanto scaldato queste parti delle candele, acciocchè il mastice vi si accollasse bene. Aggiungo ancora che alcune volte coprii anche tutta la parete delle candele con lo stesso mastice in modo da lasciare utilizzabile solo il fondo, e che altra volta mi accadde di coprire quest'ultimo o parte delle pareti delle candele per inutilizzare porzioni che non mi davano molta garanzia di essere poco porose. Inoltre a proposito delle candele Kitasato, debbo dire che le ho adoperate sempre troncate in modo da ridurle almeno alla metà di altezza, e, a proposito delle Maassen, che ne ho utilizzato il fondo e piccola parte delle pareti prossimiori, usando una disposizione che ho poi veduta descritta da altro autore e che consiste nell'introdurre entro le candele un tubo di vetro che si fa stare a posto per mezzo di due tappi di gomma forati; quello inferiore si avvicina più o meno al fondo della candela a seconda che si vuole utilizzare solo il fondo o parte delle pareti: per filtrare il materiale naturalmente lo si versa entro il tubo.

Costantemente, dopo la scelta delle candele, ho seguito la pratica indi-

cata dal De Blasi, di farle attraversare da acqua distillata nelle stesse condizioni in cui veniva filtrata la polpa vaccinica. Così varie candele che non si lasciavano attraversare che difficilmente o molto lentamente dalla stessa acqua distillata, le ho scartate perchè esse avrebbero prolungato di troppo la filtrazione.

Le candele furono sempre raccordate ad appositi recipienti per la raccolta del liquido filtrato.

La disposizione più semplice la adottai per le candele Silberschmidt e per le Maassen. Introdussi ogni candela in un tappo di gomma a largo foro e poi con questo chiusi l'orifizio di una bottiglia a tubolatura laterale, nella quale era possibile fare il vuoto.

La disposizione per le Chamberland, in quelle poche volte che mi servii della pressione, consistette nella solita chiusura nel manicotto metallico e successivo avvitamento di questo all'apparecchio Gay-Lussac: per solito ebbi però cura di diminuire la superficie filtrante della candela coprendola sino a 2-3 centimetri dal collo con mastice o cera. Quando, invece, mi servii dell'aspirazione, segai le candele e nella porzione del cilindretto col fondo rimasto intatto, introdussi un tappo di gomma a un foro nel quale a sua volta introdussi un tubo piegato a doppia squadra la cui branca verticale entrava nel foro di un altro tappo, che chiudeva l'orifizio di un recipientino a tubulatura laterale.

Per le Kitasato adottai la stessa disposizione che per le Maassen: però al di fuori del tappo di gomma, lasciai debordare alquanto la candela e in questo moncone innestai un tubetto di vetro e coprii candela e bordo del vetro con mastice di Archanson.

Questo tubo serviva per versarci dentro il liquido da filtrare. Il più delle volte, però, introdussi la candela per il suo estremo pervio in un tubo di gomma raccordato al recipiente di raccolta del filtrato e coprii il punto d'innesto con mastice di Archanson.

Per le Berkefeld adottai diverse disposizioni. Dapprima usando le piccole candele introdussi il collo di esse in recipientini a fondo forato e costrinsi le candele a rimanervi aderenti coll'intermezzo di un anello di gomma, avvitando un dado al disotto del fondo del recipiente, attorno al collo della candela. Introdussi poi questo collo nel foro di un tappo di gomma e con questo chiusi l'orifizio del recipiente di raccolta del filtrato. Tale del resto è il dispositivo che indica la fabbrica. In prosieguo, trovai più conveniente ricorrere a una disposizione che mi permetteva di poter pulire la candela e perciò ricorsi a quello già descritto per le Kitasato e per le Chamberland, con raccordo diretto al recipiente di raccolta del filtrato. Perciò, nel collo metallico o di vetro delle candele, piccole o grandi, introducevo un corto tubo di gomma che innestava nella tubulatura laterale di una boccia in cui facevo il vuoto. Nel collo di questa introducevo poi un tappo di gomma ad un foro, nel quale facevo entrare la branca verticale di un tubo di vetro piegato a squadra, mentre la parte orizzontale di esso, fornita di una bolla ripiena di cotone, veniva raccordata col tubo della pompa per il vuoto.

Le candele, dopo ben messe a posto, venivano introdotte in un recipiente tubulare contenente il liquido da filtrare, liquido che, infatti, col vuoto fatto nel recipiente di raccolta, era costretto ad attraversare le

pareti della candela e ad accumularsi in esso. Terminata la filtrazione, bastava sollevare in alto l'apparecchio per togliere la candela dal recipiente e rovesciare un po' in alto la candela stessa, perchè il liquido contenutovi passasse appunto nel recipiente.

Quando poi il filtrato non doveva adoperarsi subito, il raccordo della candela invece che con la tubulatura laterale del recipiente, si faceva con un tubo di vetro piegato a doppia squadra, il quale entrava nel foro del tappo di gomma che chiudeva la boccetta; la tubulatura laterale ripiena di cotone, serviva per raccordarla alla pompa per fare il vuoto.

Inoltre quando occorreva distribuire il filtrato in varie porzioni, da utilizzarsi in tempi diversi, invece di boccette a tubulatura laterale, mi sono servito di specie di separatori da chimica col fondo a imbuto, fornito di rubinetto. Naturalmente il collo dell'imbuto veniva protetto entro un tubo da saggio che si costringeva a starci aderente per mezzo di un anello di ovatta, e il tappo di gomma possedeva un altro foro nel quale si faceva entrare un tubo piegato a squadra con la sua parte verticale; l'orizzontale, con la solita bolla piena di cotone, si raccordava alla pompa per il vuoto.

Usando la disposizione descritta per le candele Berkefeld, Chamberland e Kitasato, riuscii a poter filtrare anche il vaccino triturato nei tre mortai di porcellana, agata e acciaio (cosa che prima non mi riusciva molto facilmente, perchè le finissime particelle, quarzose e metalliche presto occludevano i pori delle candele) e, ciò, perchè la candela essendo libera e mobile, io poteva pulirla quante volte voleva. A tal uopo, per mezzo di uno spazzolino a setole sottili e robuste, ogni 20-40 secondi spazzolavo le pareti della candela nel recipiente stesso in cui era il liquido da filtrareo, od ogni 2-3 minuti, sostituendo ad esso un bicchiere a calice contenente Na Cl al 0,85 per cento: in tal caso sospendevo la filtrazione stringendo con una pinza il tubo di gomma raccordato al recipiente di raccolta del liquido, per evitare che delle bolle d'aria entrassero in esso e vi si formasse della schiuma.

Del resto anche man mano che il materiale filtrava, ebbi speciale cura di evitare che dell'aria entrasse, attraverso i pori delle candele, nel recipiente: quindi, quando il liquido diminuiva e parte delle pareti delle candele venivano allo scoperto, versavo nuovo liquido da filtrare e in ultimo del Na Cl al 0,85 per cento.

Solo quando la messa in opera non mi permetteva di evitare questi inconvenienti, di solito interrompevo a tempo la filtrazione prima che si formasse della schiuma.

Ho detto più volte che la filtrazione del liquido veniva favorita dal vuoto sino ad 1 atmosfera: debbo però aggiungere che tale fu il vuoto che si potè ottenere nei recipienti nell'Istituto d'Igiene di Cagliari: nelle prime ricerche fatte nel 1903 a Roma non potei raggiungere vuoto superiore a quello corrispondente a 640 mm. di hg.

***

Viene poi da sè che tutto quanto serviva per la filtrazione, veniva in precedenza sterilizzato accuratissimamente; aggiungerò anzi che, non appena

ottenuti i primi risultati positivi, personalmente, sorvegliai la sterilizzazione delle candele e dei recipienti.

A tal uopo i recipienti di vetro e i tubi, venivano una prima volta sterilizzati a secco e una seconda nell'autoclave a 1 atmosfera e mezza di pressione. Le candele venivano sterilizzate una prima volta nella stufa di Koch e poi montate. Gli apparecchi completi, con le loro varie parti avvolte in carta bibula, venivano ancora una volta sterilizzate a 110° nell'autoclave. Si tenevano poi sempre pronte per le opportune divisioni dei liquidi filtrati, pipette sterilizzate graduate o no, provettine di diverse dimensioni, batuffoli di ovatta sterilizzata, ecc.

***

I filtrati ottenuti, venivano seminati in agar e in brodo per vedere se erano sterili: con certi filtrati vennero eseguite anche colture in sacchetti di collodion appositamente fatti.

Le semine in agar si facevano o a piatto nelle capsulette o in questo substrato solidificato a becco di clarino, versandovi sopra 1-2 gocce del liquido prelevato con pipette sterilizzate. Nello stesso modo si facevano le semine in brodo; solo si ebbe cura di far pervenire le gocce nel liquido colturale rasente alla parete del tubo, come consiglia Beyerinck, osservando poi giornalmente l'aspetto del materiale nel punto di contatto dei due liquidi.

I substrati innestati venivano posti in termostato, ove si ebbe cura di mantenerli a una temperatura ben regolata intorno ai 37° C. I tubi che rimanevano sterili, al 7°, 8°, 9° giorno, a seconda dei casi, venivano tolti dalla stufa, esaminatone per ogni buon fine al microscopio il contenuto e scartati: quelli che risultavano inquinati, tolti subito, e i relativi filtrati messi da parte.

Infine debbo aggiungere che il più delle volte al liquido da filtrare aggiunsi colture di prodigioso, di piocianeo, di fluorescente o a volte, per date ricerche, quelle di stafilococco, e ciò allo scopo di accertarmi se la candela usata volta a volta potesse lasciare passare germi visibili. Di solito emulsionavo in brodocolture patine degli stessi germi sviluppatesi su agar a becco di clarino, e queste brodocolture aggiungevo, senza diluirle, al liquido da filtrare.

Quanto alle colture nei sacchetti di collodion, tenevo pronti dei tubetti di vetro chiusi da un lato da una membrana di collodion e contenenti del brodo. Semenzavo questo liquido e poi ponevo i sacchetti dopo averli chiusi alla lampada nel peritoneo dei conigli. Dopo 5-7 giorni li toglievo e facevo passaggi dal loro contenuto nei comuni terreni, nonchè, occorrendo, esami microscopici.

Perchè sia chiarita la modalità tecnica da me adottata per fare colture nei tubetti di collodion, modalità che mi ha reso possibile di poterne fare molti e senza perdita nè di tempo nè di materiale, la riferisco con qualche dettaglio.

I tubetti venivano prima tirati alla lampada da un lato in modo da farne specie di boccette senza fondo: versavo intanto del collodion sopra

un piano di vetro e appena essiccato, lo tagliavo a quadratelli coi quali chiudevo il fondo delle bottigliette costringendone i bordi a rimanere aderenti al vetro per mezzo di altro collodion liquido. Fatti così i tubetti, si riempivano sino a metà di brodo e si introducevano entro un tubo da saggio contenente altro brodo, ma non in tale quantità da superare il collo della bottiglietta. Si sterilizzavano quindi i tubi nella stufa come ordinari tubi di brodo e al momento opportuno si innestavano con il materiale, facendo in modo che pervenisse nell'interno della bottiglietta. Quindi si tirava fuori questa da ciascun tubo da saggio e, tiratone alla lampada il collo, si copriva tutto il vetro con collodion, badando di non toccare con esso la membranella di collodion che ne costituiva il fondo.

III.

Esperienze sulla filtrabilità del virus vaccinico.

Premessi tutti questi dati di tecnica (che ho riportato con molti dettagli perchè sono convinto che dalla applicazione di essi dipese il buon esito dei miei esperimenti) dirò subito che i filtrati di polpa vaccinica, di cui parlo nel presente lavoro, sono quelli ottenuti attraverso le Berkefeld, le Chamberland, le Kitasato, le Silberschmidt, le Maassen e che tralascio di parlare dei primi ottenuti attraverso le candele calcaree, reputando inutile complicare il lavoro con esperienze fatte con filtrati attraverso materiali che non sono in commercio e che non è tanto facile avere.

Aggiungo ancora che i filtrati sono stati sperimentati contemporaneamente sulle cornee dei conigli e sulla cute dei cani tutte le volte che è stato possibile. Quando gli animali su cui inocularli sono mancati, mi sono accontentato o di inocularli solo nella cornea, o di inocularli soltanto sulla cute.

Ho scelto l'innesto endocorneale nei conigli, perchè per unanime consenso di tutti gli autori la lesione del Guarnieri, che in essa determina il virus vaccinico, è così caratteristica da non potersi confondere con altre. Ho scelto l'innesto cutaneo sui cani, perchè potei convincermi presto che i cani giovani sono sensibilissimi all'infezione vaccinica conformemente alle risultanze del Sanfelice e Malato, che li trovarono come il Dupuis e il Weiskopf sensibili anche al vaiuolo (1). Le poche, a dir vero, prove da me fatte in paragone, sul coniglio, mi convinsero che quest'animale è assai meno sensibile del cane all'infezione vaccinica: non credetti quindi opportuno di usarlo invece del cane. Del resto Calmette e Guerin (2) lo ritennero atto a mettere in evidenza solo l'attività di vaccini che sono molto virulenti: quei vaccini che nel bambino e nelle vitelle danno pustole mediocri, nel coniglio non producono alcun fatto, essendo quest'animale meno recettivo delle vitelle e del bambino.

(1) Studi sul vaiuolo. Questi Annali, vol. XIII, 1903, p. 1, Roma.
(2) *Recherches sur le vaccin expérimentale*. Annales de l'Institut Pasteur, 1901, T. XVI, p. 161.

Dopodichò, dirò senz'altro che l'esame microscopico delle cornee inoculate coi filtrati, assolutamente amicrobici, non ha dimostrato che qua e là qualche raro *cythoryctes*, mentre quello delle cornee inoculate con la corrispondente polpa vaccinica non filtrata, ha messo in chiaro il solito abbondante reperto così bene descritto dal Guarneri.

Fissando però le cornee col metodo indicato dal Retzmann per lo spirochete di Schaudinn e Hoffmann, e colorando coll'azzurro II e l'eosina sono riuscito a scoprire tra cellula e cellula e anche entro le cellule degli ammassi di sostanza granulare, male definibili, i quali parrebbèro riportarsi a quelli che si osservano nei filtrati sedimentati o precipitati, come dirò in seguito.

Ciò non toglie però che vi siano dei filtrati che possono anche produrre il fenomeno guarneriano microscopico e che per altro all'esame microscopico risultano privi di batteri coltivabili nei comuni terreni. Anche il Negri (1) ha riprodotto i *cythoryctes*, con un filtrato ottenuto attraverso Berkefeld V a 3 atmosfere di pressione, il quale filtrato l'A. assicura, dietro le semine abbondanti fatte nei più svariati terreni nutritivi, nelle più diverse condizioni, che era privo di microrganismi coltivabili.

Però non v'ha dubbio che quando i filtrati determinano la produzione di molti *cythoryctes* producono delle ulcerette che si presentano con un alone di infiltrazione infiammatoria, proprio come ha osservato il Negri, particolare questo che a mio avviso non è trascurabile, dacchè non l'ho rilevato nelle ulcerette ottenute con filtrati che non producono *cythoryctes*, o che almeno non li producono in abbondanza. D'altro canto è anche certo che si può ottenere questo reperto con i filtrati assolutamente amicrobici quando vengano inoculati insieme ad un micrococco aureo che ho isolato dal vaccino, ma in condizioni da essere incoltivabile nei comuni terreni (tenuto p. es. 10 giorni in glicerina a 37°) sul quale micrococco avrò occasione di tornare più volte nel contesto del lavoro. È un cocco che per molti caratteri risponde a quello isolato da Sanfelice e Malato da casi di vaiolo, secondo gli AA. capace di produrre *cythoryctes* nelle cellule corneali dei cani (2).

(1) Loco citato.

(2) L'incoltivabilità nei comuni terreni si ottiene emulsionandolo in glicerina a ½ concentrazione. Posta l'emulsione a 37°, dopo 3 giorni, non si coltiva più nei comuni terreni e dopo 7 nel brodo nei sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli. Lo stesso germe, sempre emulsionato in glicerina e tenuto nelle identiche condizioni in cui si mantiene il vaccino, si è trovato incoltivabile dopo 31 giorni nei comuni terreni e dopo 53 nei sacchetti di collodion.

Intanto, e questo mi pare il fatto più saliente, le lesioni corneali prodotte dai filtrati contenenti il micrococco aureo in queste ultime condizioni, si sono dimostrate trasmissibili in serie per un numero indefinito di passaggi (mi sono arrestato al 32°), mentre quelle prodotte dai filtrati del tutto amicrobici, si interrompono facilmente: al di là del 7° passaggio in un caso, dell' 11° in un altro, del 3° in un altro ancora, non sono riuscito infatti per ora a trasmetterle.

***

Tanto le cornee inoculate coi filtrati capaci di produrre *cythoryctes*, quanto quelle inoculate coi filtrati capaci di produrli riinoculate con polpa vaccinica attiva, non si mostrarono immunizzate.

Non riporto però alcuno degli esperimenti eseguiti con questi filtrati sulla cornea dei conigli, dacchè ho più volte potuto constatare che la cornea non si immunizza neanche colla polpa vaccinica. Il Prowazek (1) del resto ha recentemente assodato, per lo appunto, che le inoculazioni nella cornea determinano un'immunità locale: solo il punto inoculato resta immune: nei punti circostanti, una nuova inoculazione di virus, produce una reazione leggera.

***

A parte le esperienze eseguite nelle cornee, volendo ora esporre gli esperimenti con un ordine che nei limiti del possibile corrisponda anche alla loro cronologia (2), passo senz'altro a distinguere i filtrati nei quattro gruppi seguenti, a seconda dell'azione di cui si mostrarono dotati, inoculti sulla cute dei cani giovani:

1) filtrati che non producono ne papulosi, nè pustolosi cutanea e che non immunizzano la cute dei cani verso l'inoculazione di polpa vaccinica attiva;

2) filtrati che non producono nè papulosi nè pustolosi cutanea ma che immunizzano la cute dei cani verso l'inoculazione di polpa vaccinica attiva;

3) filtrati che producono papule e pustole sulle cute dei cani;

4) filtrati che producono sole papule sulla cute dei cani.

(1) *Unter u. d. Wesen d. Waccineerregers.* Deutsch. med. Woch. 1905, n. 19, p. 752.

(2) Naturalmente per potere dedurre dalle ricerche dati di un qualche valore, l'ordine cronologico non ho potuto mantenerlo che nelle linee generali: trattandosi di un lavoro eseguito in due epoche e con materiale di cui non poteva usufruire continuativamente, nei dettagli degli esperimenti, l'ho dovuto il più delle volte sacrificare.

1. — *Filtrati che non producono nè papule nè pustole sulla cute dei cani e che non immunizzano la cute di questi animali contro l'infezione che determina la polpa vaccinica attiva.*

Sono tutti filtrati, ottenuti attraverso candele Berkefeld comuni, Kitasato, Chamberland F e B, provenienti da polpa vaccinica pestata in un comune mortaio senz'aggiunta nè di sabbia, nè di farina fossile, nè di quarzo, quindi sottoposti ad una triturazione, dirò così, rudimentale.

Non riporto i risultati dell'inoculazione di questi filtrati negli animali: essi furono uguali a quelli di tutti coloro che mi hanno preceduto in quest'ordine di ricerche, dacchè nessuno dei filtrati ha prodotto la benchè minima lesione nè sulla cute dei cani nè sulla cornea dei conigli.

Se ne parlo è per dire che, guarita la ferita prodotta dallo strumento scarificatore, *i cani rivaccinati con polpa vaccinica attiva, si mostrarono recettivi al virus*, cioè si svilupparono delle tipiche pustole vacciniche sulla loro cute.

2. — *Filtrati che non producono nè papule nè pustole sulla cute dei cani, ma che immunizzano la cute di questi animali contro l'infezione che determina la polpa vaccinica attiva.*

Sono filtrati ottenuti pestando grossolanamente polpa vaccinica insieme a farina fossile in un mortaio, pressando il pane ottenuto col torchio Buchner a 300-500 atmosfere e facendo quindi passare il liquido attraverso piccole candele Berkefeld comuni.

Riferisco in dettaglio questi esperimenti presso a poco come si ricavano dal diario, con le prove per giudicare dell'attività della polpa vaccinica usata, dell'amicrobicità del filtrato, della sua azione secondo che i filtrati vennero inoculati per la via cutanea o endovenosa negli animali ecc.

Esperimento I.

21 marzo 1903. Vaccino Leoni I, raccolto da 15 giorni e frattanto conservato in glicerina diluito con acqua nel rapporto di 1 a 3.

23 marzo. Si innesta nella cornea di un coniglio.

Si pressa sino a 300 atmosfere e il pressato viene inoculato nella cornea di un coniglio.

Si semina a piatto in agar il vaccino e il pressato ottenuto a 50 e a 300 atmosfere.

24 marzo. Si filtra il pressato attraverso piccole Berkefeld comuni e in 5-10 minuti si ottiene quasi tutto il filtrato che era possibile ricavare dal pressato stesso.

Questo filtrato si inocula sulla cornea di tre conigli (dei quali uno va perduto) e in un solo occhio per coniglio, sulla cute di un primo cane e

poi successivamente di altri tre; nelle vene di un primo cane e poi di un secondo.

Si innesta anche lo stesso filtrato in brodo, in agar e in gelatina.

25 marzo. Si ottiene la tipica lesione corneale nel coniglio inoculato con la polpa vaccinica non filtrata.

26 marzo. Si estirpa l'occhio del coniglio inoculato col pressato nel quale parve si fosse iniziato il fenomeno guarneriano (l'esame istologico a suo tempo praticato rivela molti *cythoryctes* endocorneali).

29 marzo. Muore l'ultimo coniglio inoculato col pressato filtrato: l'esame istologico della cornea a suo tempo praticato non rivela alcun *cythoryctes*: la lesione macroscopica del resto era mancata in questo come negli altri conigli.

2 aprile. Fino a quest'epoca i cani inoculati sulla cute e nelle vene con filtrati, nulla presentarono che fermasse l'attenzione. Si inoculano allora ambedue, sulla cute, con polpa vaccinica attiva e per controllo si inocula un cane sano, del pari sulla cute.

7 aprile. Si osservano pustole sulla cute del cane sano in tutti i punti scarificati. Una sola in uno dei cani inoculati nelle vene e varie, ma piccole, nell'altro.

Non si osserva alcuna pustola sulla cute dei quattro cani precedentemente inoculati con filtrato di polpa vaccinica pressata e filtrata: solo in uno si notano 1-2 scarificazioni arrossate.

21 aprile. Si inoculano con polpa vaccinica attiva i cinque cani di cui sopra senza risultato.

12 maggio. Si ripete la prova con lo stesso risultato.

11 giugno. Si ripete ancora. Nel solo cane inoculato nelle vene che aveva mostrato una sola pustola il 7 aprile, il giorno dopo, 12 giugno, presenta dei punti scarificati, in corrispondenza dell'inguine, coperti di pus.

Faccio notare che l'esame batteriologico del vaccino tal quale, pressato, filtrato, diede i seguenti risultati:

1) nel vaccino tal quale si trovano 156,600 batteri per cmc. rappresentati da 16 *stafilococchi p. aurei*, da 2150 *b. plicatus mucosus* e da moltissime colonie di *b. subtilis*;

2) nel vaccino pressato a 50 atmosfere si trovarono 840 colonie di batteri per cmc. di cui 3 sole *stafilococchi aurei* e in quello pressato a 300 atmosfere 560 di cui 4 di *stafilococchi aurei*, altre di *b. subtilis*, di varii fluidificanti comuni dell'aria (il *liquefaciens*, il *fluorescens liquefaciens* ecc.);

3) nel filtrato, dopo 8-22 giorni, nessun germe si trovò che potesse mettere in sospetto che esso non fosse sterile.

Faccio ancora notare che il pressato fu diviso in 7 porzioni ognuna di 8-10 cmc. e fu filtrato attraverso 7 candele, non senza aver aggiunto a ciascuna porzione un batterio noto: il batterio prodigioso a due, il fluorescente a due, il fluorescente e il proteo volgare ad altre due, lo stafilococco alla settima. Una delle candele lasciò passare il b. prodigioso, un'altra il proteo volgare e non il fluorescente, le altre non lasciarono passare alcun germe. Per le prove venne usato il filtrato ottenuto attraverso la seconda candela, che fu quella che non lasciò passare il b. prodigioso, e il filtrato ottenuto attraverso la settima, che fu quella che non lasciò passare lo stafilococco.

Da questo primo esperimento si ricava che il virus vaccinico che, ancora dopo pressato a 300 atmosfere, fu capace di dare pustole sulle cute dei cani e il fenomeno del Guarneri nella cornea dei conigli, e che non ha più prodotto nè l'uno nè l'altro fenomeno dopo filtrato attraverso comuni Berkefeld piccole, che non lasciarono passare alcun batterio visibile, ha immunizzato i cani dell'inoculazione cutanea di polpa vaccinica attiva ripetutamente eseguita alla distanza di 19, 30, 60 giorni l'uno dall'altra.

Viceversa lo stesso filtrato inoculato nelle vene non li immunizzò affatto; però il numero degli innesti in cui si sviluppo la pustola vaccinica fu scarsissimo, e in uno dei cani è discutibile si trattasse di una vera pustola vaccinica dal momento che l'animale non si mostrò immune di fronte ad una seconda vaccinazione con pus vaccinico non filtrato.

Esperimento II.

25 settembre 1903. Vaccino Gualdi I, con l'aggiunta di altrettanto Na Cl al 0,85 %, pestato dopo 2 ore grossolanamente in un mortaio insieme a farina fossile e pressato subito dopo a 500 atmosfere.

Il liquido ottenuto venne filtrato attraverso una comune Berkefeld piccola insieme al b. prodigioso e al b. fluorescente, ed il filtrato ottenuto venne innestato subito in diversi terreni di coltura.

30 settembre. I terreni di coltura innestati essendo rimasti sterili, si ha la certezza che la candela ha trattenuti i comuni batteri, e che il filtrato non contiene batteri coltivabili nei comuni terreni.

3 ottobre. Il pressato e il filtrato si inoculano, ciascuno, sulla cute scarificata di un cane, nella cornea di un coniglio, sulla cute del braccio di bambini, mai stati vaccinati.

13 ottobre. Il pressato inoculato sulla cute di cani non produsse nè papule nè pustole: il filtrato inoculato sulla cute scarificata dei bambini, nella cornea dei conigli e sulla cute del cane si mostrò sfornito di qualunque azione.

14 ottobre. Si inocula sulla cute, con vaccino Leoni commerciale, il cane inoculato sulla cute col filtrato il 3 ottobre e contemporaneamente un altro cane sano, sempre sulla cute, collo stesso vaccino Leoni per vedere se si tratta di vaccino attivo. La rivaccinazione nei bambini si fa pure verso quest'epoca con lo stesso vaccino.

30 ottobre. Nessun fatto degno di nota presenta il cane stato dapprima inoculato col filtrato: il cane sano invece presenta pustole in quasi tutti i punti scarificati.

Anche i ragazzi rivaccinati presentarono qualche pustoletta nei punti scarificati (1).

---

(1) Ringrazio il collega ed amico prof. Biagi per avermi aiutato in queste ricerche.

Questo secondo esperimento dimostra che il filtrato di un vaccino grossolanamente ridotto in poltiglia, proveniente anche da un pressato dimostratosi inattivo sulla cute dei cani e a sua volta inattivo per la cute dei cani e dei bambini e per la cornea dei conigli, ha ancora immunizzato i cani verso l'inoculazione di polpa vaccinica sicuramente attiva.

Per quanto qui non sia il luogo di spiegare questo modo di diportarsi dei filtrati, tuttavia, non posso a meno di riferire alcuni esperimenti che ho praticato sul riguardo. Essi sono i seguenti:

Inoculai sulla cute di un giovanissimo cane filtrato di vaccino Pavia ottenuto attraverso una Berkefeld *W* e trattato col metodo Green (Vedi cap. IV). Questo filtrato produsse lesioni appena apprezzabili nei punti scarificati: papule e anche in scarso numero.

Dopo 23 giorni dalla vaccinazione fatta, rivaccinai l'animale con lo stesso filtrato conservato per tutto questo tempo all'oscuro e al fresco. Nulla avendo ottenuto, dopo altri 7 giorni, inoculai sulla cute del cane il micrococco aureo, già ricordato, tratto da coltura di 48 ore ed emulsionato in glicerina diluita a metà con acqua, da pochi minuti, nonchè lo stesso materiale tenuto a 37° per 72 ore, e altro tenutovi per 8 giorni e poi per 4 a temperatura ordinaria. Contemporaneamente praticai semine delle emulsioni nel brodo contenuto in sacchetti di collodion, che posi nel peritoneo di un coniglio, e altre nei comuni terreni, per vedere se il germe fosse anche coltivabile o no dall'emulsione.

Perchè l'esperimento riuscisse, essendo praticato sopra un solo animale (non potei farlo sopra quattro cani perchè per il momento non li possedevo, e d'altro canto considerai più esatto farlo sopra uno solo) tenni, il paziente, immobilizzato sopra un tavolo per 3 giorni, curando in modo specialissimo le condizioni di alimentazione e di temperatura ambiente.

L'inoculazione venne eseguita il 3 marzo 1905 sulla cute della parete addominale rasa.

1) A destra e in avanti venne inoculata la emulsione appena fatta;
2) A sinistra e indietro quella tenuta 72 ore nel termostato.
3) A sinistra e in avanti ed a destra e indietro, quella tenuta 8 giorni a 37° e 4 a temperatura ordinaria.

Il 7 e l'8 marzo si trovarono delle pustole a destra e in avanti e a sinistra e indietro, nei tre punti scarificati.

Il 15 marzo già le pustole erano quasi guarite: in nessuno degli altri punti si osservarono nè crosticine, nè pustole.

Il 19 marzo il cane era guarito, quando improvvisamente morì.

Ora siccome l'emulsione inoculata a destra in avanti, conteneva il micrococco coltivabile ancora nei comuni terreni, quello a sinistra indietro l'emulsione contenente lo stafilococco coltivabile solo nei sacchetti di collodion, quella a sinistra in avanti e a destra indietro, l'emulsione non coltivabile neanche in questi ultimi, la conclusione da trarne era questa che *non si erano sviluppate pustole in quella*

porzione di cute in cui si era inoculata l'emulsione dello stafilococco dalla quale questo era prelevabile in condizioni da non svilupparsi nè in comuni terreni nè nei sacchetti di collodion.

Considerando ora le condizioni in cui si trovano i vaccini commerciali, dai quali difficilmente, se bene conservati, si coltivano stafilococchi, e particolarmente quello del Leoni che io usai per le prove immunizzanti eseguite nel 1903, che ho trovato privo di questi piogeni coltivabili in agar, e considerando i risultati degli esperimenti eseguiti nel 1903, è evidente potessi dedurne che il *vaccino filtrato attraverso candele che non lasciano passare alcun batterio visibile, immunizza i cani contro il vaccino puro messo in commercio come attivo e che all'esame batteriologico risulta privo di stafilococchi coltivabili: non immunizza contro il vaccino attivo che contiene stafilococchi coltivabili sia pure soltanto in brodocolture fatte in sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli.*

3. — *Filtrati che producono papule e pustole sulla cute dei cani.*

Sono filtrati di polpa vaccinica bene triturata insieme a quarzo in mortaio di porcellana prima e poi d'agata, ottenuti attraverso candele Berkefeld ad una atmosfera di pressione negativa. Essi possono distinguersi nei tre gruppi seguenti:

1° filtrati di cui non si può garantire la sterilità per mancanza dei reperti dell'esame batteriologico;

2° filtrati di cui si può garantire la sterilità, nel senso batteriologico della parola, ma che produssero pustole da cui, quando venne praticato l'esame batteriologico, si potè isolare il micrococco aureo;

3° filtrati che non risultarono sterili all'esame batteriologico e che hanno prodotto eruzioni pustolari senza i caratteri specifici di quelle vacciniche.

Primo gruppo di filtrati.

ESPERIMENTO I.

8 novembre 1903. Vaccino Gualdi II, ricavato da una vitella innestata con vaccino tratto da altra vitella, che era stata inoculata con vaccino umanizzato. Al vaccino, appena raccolto, si aggiunge altrettanto Na Cl al 0.85 %, e si pesta in un mortaio insieme a farina fossile. Si pressa a 500 atmosfere e il liquido si comincia a filtrare attraverso una prima piccola Berkefeld comune e poi attraverso una seconda, dacchè la precedente si era mostrata estremamente dura. Si ottiene così un liquido chiaro, limpido, poco denso. Parte di esso si pone in un essiccatore su $H^2 SO^4$, e nel vuoto.

11 novembre. Il vaccino filtrato concentrato nel vuoto, si inocula sulla cute di un cane a mezzo delle solite scarificazioni e sulla cornea dell'occhio sinistro di un coniglio.

Il vaccino filtrato, ma non concentrato, si inocula sulla cute di un cane a mezzo delle solite scarificazioni.

— novembre. Tanto nell'uno, quanto nell'altro cane si svilupparono delle evidenti pustole in alcuni punti scarificati. Non potrei precisare la data in cui fu fatta l'osservazione perchè dovetti, per ragioni indipendenti da me, interrompere gli esperimenti. Feci anche colture dalle pustole che mi andarono necessariamente perdute, salvo una in cui trovai un cocco aureo, in coltura pura, cocco che non potei però identificare con altri per mancanza di tempo.

Esperimento II.

4 gennaio 1905. Il vaccino canino I, raccolto il 25 dicembre 1904, e conservato in glicerina pura neutra, si diluisce e si filtra attraverso una Berkefeld *V*, precedentemente provata.

14 gennaio 1905. Il filtrato ottenuto, si inocula sulla cute scarificata di un piccolo cane, e contemporaneamente se ne inocula un altro con il vaccino stesso, ma non filtrato. Si fanno anche colture, ma sgraziatamente vanno perdute.

17 gennaio. Si osserva qualche pustola qua e là nei punti innestati con il vaccino non filtrato.

19 gennaio. Compaiono delle pustole anche nei punti innestati con il vaccino filtrato.

23 gennaio. Si inoculano le cornee di un coniglio con lo stesso filtrato.

27 gennaio. Osservando giornalmente gli occhi dei conigli, nulla sino a quest'epoca si scorge che possa riferirsi al fenomeno del Guarneri. Frattanto l'esame batteriologico del contenuto delle pustole sviluppatesi sulla cute dei cani tra gli altri germi rivela la presenza del micrococco aureo.

Secondo gruppo di filtrati.

Esperimento III.

7 maggio 1903. Vaccino Leoni II, parte inviato il 29 aprile, parte il 5 maggio, subito dopo raccolto il materiale dalle vitelle. Si tratta di 100 gr. di vaccino che si pestano in un mortaio insieme a farina fossile e si pressano subito a 500 atmosfere, ottenendo un liquido gialliccio, piuttosto denso, perfettamente limpido.

Esso si inocula subito nella cornea di un coniglio. Si filtra lo stesso giorno, attraverso una piccola Berkefeld comune, scelta su nove, aggiungendo al liquido il b. prodigioso.

Il filtrato si inocula sulla cute dell'addome di un cane.

8 maggio. Si inocula il filtrato nella cornea di un coniglio e in agar a piatto; lo stesso si fa del vaccino non filtrato e del vaccino pressato.

10-11 maggio. Nelle cornee di tutti i conigli si osservano fatti che si riportano alla lesione guarneriana; i più intensi e manifesti si hanno però

dall'innesto del vaccino puro (in questa cornea si trovano a suo tempo anche i *cythoryctes*).

12 maggio. — Si ripete l'inoculazione del filtrato nella cornea di un altro coniglio.

14 maggio. Si ottiene lo stesso risultato cui condusse l'identico esperimento eseguito l'8 maggio.

Intanto il cane inoculato il 7 maggio, presenta molti punti scarificati perfettamente guariti; due di essi sono però arrossati e coperti di un materiale molle di aspetto lardaceo.

Si fanno colture da questo materiale.

19 maggio. Si isola il micrococco aureo, il micrococco candicans, un b. similtifo, il b. sottile.

20 maggio. Guarite le lesioni si inocula il cane con vaccino attivo nuovo; ma, nessuna pustola si sviluppa.

Debbo far notare che l'esame batteriologico del vaccino tal quale, pressato e filtrato ha dato i seguenti risultati:

1° nel vaccino tal quale si sono numerati da 126 a 700 colonie per cmc., di cui 16 date da uno stafilococco;

2° nel vaccino pressato si sono numerate pochissime colonie di cui una sola di stafilococco;

3° il vaccino filtrato s'è dimostrato sterile.

Inoltre debbo aggiungere che si è eseguito il 15 maggio un altro esperimento inoculando nelle vene di un piccolo cane 5 cmc. di filtrato.

20 maggio. Si è inoculato sulla cute questo cane, e un altro cane sano con pus vaccinico Pavia.

29 maggio. Si sono sviluppate pustole sulla cute di ambedue i cani; soltanto, quelle del cane inoculato prima col filtrato nelle vene, cominciavano già a regredire, mentre quelle del cane sano erano in pieno rigoglio.

Esperimento IV.

1° marzo 1905. Si inocula sulla cute di un cane vaccino Pavia, fornitomi gentilmente dal dott. Brotzu, il 26 febbraio 1905, e si ottiene una copiosa eruzione pustolare da cui il 7 marzo si raccoglie il vaccino canino V.

9 marzo. Il vaccino canino V si tritura bene in mortaio di porcellana e poi d'agata insieme a quarzo, si diluisce il materiale in circa 300 cmc. di NaCl al 0.85 %, e si filtra attraverso una candela Berkefeld *W*, aggiungendo al liquido da filtrare il b. prodigioso e il b. piocianeo, e si fanno subito colture dal filtrato.

12 marzo. Le colture rimangono sterili; la candela ha trattenuto il b. prodigioso e il b. piocianeo.

Si concentra allora il liquido nel vuoto e in bagno-maria a 42° (avendo la certezza che il filtrato non ha mai assunto una temperatura superiore ai 30°) sino a ridurlo a 10-15 cmc. Si semina quindi il concentrato in agar e s'inocula sulla cute di una cagna con le solite scarificazioni.

14 marzo. In corrispondenza degli inguini della cagna cominciano a comparire delle pustole che vanno facendosi poi sempre più evidenti nei giorni successivi.

18 marzo. Le colture fatte dal concentrato sono ancora sterili.

Esperimento V.

15 marzo 1905. Parte dello stesso vaccino canino V, si tritura in presenza di quarzo in mortaio di porcellana e d'agata, e si filtra attraverso una Berkefeld *W*, raccogliendo dopo 27 minuti, 12 cmc. di liquido. Di questo qualche goccia si innesta in agar.

Inoltre si pratica un innesto sulla cornea di un coniglio.

17 marzo. Le colture sono sterili; nell'occhio del coniglio si osserva una lesione che non si saprebbe distinguere da quella guarneriana. Disgraziatamente il coniglio muore.

17 marzo. Si ripete la prova sopra un altro coniglio.

18 marzo. Si inocula il filtrato sulla cute scarificata di una giovanissima cagna.

19 marzo. I punti inoculati sono tutti arrossati.

20 marzo. Si osserva nella cornea di un coniglio la lesione guarneriana; si estirpa quindi l'occhio per procedere all'esame istologico della cornea.

23 marzo. Solo in un punto si osserva una pustola; questa era comparsa sino dal 20 marzo, e per quanto mi fosse sorto il dubbio si trattasse di un fatto accidentale, tuttavia era innegabile che era sorta sopra uno dei punti scarificati e che aveva tutto l'aspetto di una pustola vaccinica.

Le colture del filtrato frattanto rimasero sterili.

Terzo gruppo di filtrati.

Esperimento VI.

22 febbraio 1905. Si inocula in un cane vaccino e dalle pustole formatesi, il 1° marzo si raccoglie il vaccino, che ho chiamato vaccino canino III.

2 marzo. Si tritura parte di questo vaccino insieme a quarzo in un mortaio di porcellana e poi d'agata, e convenientemente si diluisce in Na Cl al 0.85 %, quindi si filtra attraverso una Berkefeld *W*, aggiungendo al liquido da filtrare una coltura di piocianeo.

Si scarifica quindi la cute di un giovane cane e si innesta nei punti scarificati un po' del filtrato ottenuto, senz'attendere l'esito dell'esame batteriologico del filtrato che contemporaneamente si pratica.

6 marzo. Tutti i punti scarificati sono guariti: in uno solo si nota una pustola.

Si accerta che la candela ha lasciato passare il bacillo piocianeo.

9 marzo. Si inocula il cane con vaccino Pavia attivo non filtrato.

14 marzo. Si ottengono splendide pustole su tutti i punti scarificati.

Riunendo ora i dati che mettono in chiaro questi e altri esperimenti eseguiti con i vari filtrati, dirò subito che ho concluso col ritenere che:

1° sia attraverso candele molto porose come le Berkefeld *V*, sia attraverso candele poco porose come le Berkefeld *W*, si possono

ottenere dei filtrati che producono delle vere pustole sulla cute dei cani e l'ulcera corneale nell'occhio dei conigli;

2° quando si sottopongono le lesioni pustolari all'esame batteriologico, il più delle volte, si isolano cocchi piogeni, anche se i filtrati sono risultati sterili e se le candele non hanno lasciato passare i comuni batteri;

3° poichè un filtrato, nel quale era passato il b. piocianeo, aveva prodotto una pustola, e non aveva immunizzato il cane, ciò fa supporre che vi siano lesioni pustolari che decorrano indipendentemente dalla infezione vaccinica.

Intanto la presenza del micrococco aureo nelle pustole provocate dai filtrati, mi spinse a ricercarlo nei filtrati stessi. Senza riferire qui con dettaglio le ricerche fatte, basterà dire che feci colture in brodo nei sacchetti di collodion, posti nel peritoneo dei conigli, col materiale appena passato dalle candele, con quello sedimentato, con altro trattato con sieri di conigli o cani inoculati coi filtrati stessi ed anche con il micrococco aureo. Sono, così, varie volte riuscito a isolare *in coltura pura* il germe ora ricordato, anche da filtrati che seminati nei comuni terreni s'erano dimostrati del tutto sterili.

Ed è questo il fatto che mi ha maggiormente impressionato, tanto da avvalorare il dubbio che la pustolosi vaccinica non sia dovuta al solo germe del vaccino, ma, all'intervento del cocco piogeno nella lesione prodotta dallo stesso germe del vaccino.

In tutti i modi ulteriori ricerche dimostravano ancora che la lesione pustolare prodotta dai filtrati era sempre una lesione trasmissibile in serie.

Ecco gli esperimenti che lo dimostrano:

A) 20 aprile 1905. Si inocula sulla cute scarificata di un cane il filtrato di vaccino canino III, conservato sino dal 1° marzo in glicerina, ottenuto attraverso una Berkefeld *W*. Si ottengono in tutto 20 cmc. di filtrato.

21 aprile. Tutti i punti scarificati sono arrossati.

24 aprile. In corrispondenza di molti di questi punti si osserva qualche crosticina giallastra.

10 maggio. Si rivaccina l'animale con polpa vaccinica attiva con risultati negativi; il cane dunque rimase immunizzato con la prima inoculazione.

B) 22 aprile. Si raschiano alcuni punti coperti da crosticine e il materiale si inocula sulla cute dell'addome scarificata di altro cane.

25 aprile. Si sviluppano nel cane splendide pustole qua e là nei punti scarificati: in alcuni luoghi sono anche confluenti.

C) 6 maggio. Si innesta sulla cute di un terzo cane un po' della raschiatura delle pustole sviluppatesi in questo secondo cane, ricavate il 25 aprile e tenute in glicerina.

10 maggio. Si sviluppano pustole evidentissime in tutti i punti scarificati.

4. — *Filtrati che producono sole papule sulla cute dei cani.*

Vari filtrati sterili ottenuti attraverso le candele che più delle altre davano garanzia di trattenere i germi invisibili, tra le Berkefeld *W*, le Silberschmidt, le Kitasato, le Chamberland *F* e *B*, le Maassen innestati sulla cute dei giovani cani, notai che non producevano pustole: i punti scarificati si arrossavano, si sollevavano e si veniva a formare una papula che al 3° giorno era già evidentissima, e al 9°, 10°, 12° giorno scompariva. Dapprima, confesso, questo modo di diportarsi del vaccino non attrasse la mia attenzione, ma in seguito, ripetendosi, sospettai che questa fosse la lesione che il vaccino era capace di produrre indipendentemente dai cocchi piogeni.

Riporto il primo esperimento che mi condusse a osservare la papulosi cutanea nei cani, dacchè tutti gli altri non ne sono che la ripetizione e quelli i quali dimostrano che tale lesione è per l'appunto trasmissibile da cane a cane.

Esperimento I.

Vaccino Leoni 1 raccolto da 15 giorni, diluito in glicerina, pressato a 100 atmosfere, e filtrato attraverso una piccola Berkefeld comune che non lasciò passare il b. prodigioso aggiunto al liquido da filtrare. Durata della filtrazione 10 minuti.

Il liquido filtrato si dimostra sterile all'esame batteriologico.

24 marzo 1903. Si innesta sulla cute di un cane a mezzo delle solite scarificazioni.

25 e 26 marzo. Nulla che fermi l'attenzione.

27 marzo. Arrossati e sollevati i bordi di qualche punto scarificato.

28 marzo. Idem.

1° aprile. Non si è sviluppata alcuna pustola: il cane è guarito.

Si scarifica allora un altro cane, per controllo, senza però innestare materiale di sorta. Non si ripetono i medesimi fatti. Nulla ferma l'attenzione.

Esperimento II.

A. 16 aprile 1905. Si inocula per scarificazione cutanea in un cane il vaccino canino III, conservato dal 1° marzo 1905 in glicerina, e anche nelle due cornee di un coniglio delle quali l'una il 18, l'altra il 21 mostrava evidente l'ulcera corneale.

21 aprile. Si osservano pustole confluenti specialmente nella parte alta dell'addome: le restanti scarificazioni sono solo fortemente arrossate. Si raccoglie il materiale pustolare.

Questo vaccino si tritura prima in mortaio di porcellana e poi d'agata e quindi in mortaio d'acciaio diluendolo in Na Cl al 0.85 %. Si ottengono così 250 cmc. di liquido che si filtrano attraverso una grande Berkefeld *W*. Questi 250 cmc. di filtrato si concentrano a 40° C, nel vuoto su $H^2 SO^4$, riducendoli dopo 3 giorni a 5 cmc.

24 aprile. Si fanno colture dal concentrato e nel contempo innesti di esso sulla cute di un cane.

26 aprile. Le colture dal concentrato rimangono sterili.

27 aprile. I punti scarificati si sono andati arrossando e sollevando. Appaiono ora delle ben decise papule sopra una zona fortemente arrossata, quasi scura.

29 aprile. Le papule sono andate regredendo; nessuna di esse si è trasformata in pustola.

10 maggio. Si inocula vaccino attivo non filtrato: ma questa rivaccinazione non attecchisce, segno evidente che l'animale è immunizzato.

B) 27 aprile. Si raschia qualche papula sviluppatasi sulla cute del cane precedente e si inocula sulla cute scarificata di un nuovo cane.

30 aprile. Evidente arrossamento e sollevamento dei punti scarificati.

2 maggio. Le papule regrediscono: nessuna di esse ha esito in pustola.

C) 1° maggio. Un po' di raschiatura di alcune papule del cane precedente si innestano sulla cute di un terzo cane barbone, piccolo.

4 maggio. I punti scarificati sono sollevati ed arrossati. Evidente papulosi ed esclusivamente papulosi cutanea.

7 maggio. Le papule sono andate regredendo: l'animale si considera in via di guarigione.

Questi esperimenti dimostrano chiaramente che il virus vaccinico filtrato attraverso le Berkefeld *W* e inoculato per scarificazione cutanea nei cani produce una papulosi che si evolve completamente nel termine di una settimana e che è trasmissibile in serie.

***

Non v'ha dubbio che tutto ciò avvalorava il sospetto che la *papula costituisse l'efflorescenza vaccinica specifica*.

Prima però di affermarlo bisogna dimostrare che col contenuto delle papule si riproduceva l'ulcera corneale nei conigli, e che da esse o non si coltivavano i cocchi piogeni, o se ne isolavano solo accidentalmente.

Quanto all'ulcera corneale, mi fu assai facile dimostrare che si poteva ottenere. Inoculai un coniglio nelle due cornee con il contenuto di varie papule bene pestate, con goccie di glicerina, entro un mortaio ed in ambedue al terzo giorno ottenni bellissime ulcerette a fondo limpidissimo. Estirpato uno degli occhi, fissatolo, sezionatolo e coloratolo a suo tempo si trovò anche qualche *cythoryctes* nelle cellule corneali.

Quanto alle colture dal contenuto delle papule ecco i risultati complessivi:

di 29	papule ne	trovai	19	sterili	cioè di 101 papule ne trovai 67 sterili.
di 21	id.	id.	18	id.	
di 17	id.	id.	11	id.	
di 12	id.	id.	7	id.	
di 22	id.	id.	12	id.	

Dalle restanti, isolai 9 volte lo stafilococco aureo e poi varie volte l'albo, e altri batteri di cui alcuni identificai ed altri lasciai indiagnosticati reputando del tutto inutile per il momento perdere tempo in diagnosi di batteri accidentali.

Non tralasciai però durante lo svolgimento di questa parte del lavoro di fare colture dalla cute dei cani sani, specialmente dirette alla ricerca dei piogeni aurei e 5 volte su 21 ottenni risultato positivo. Avrei dunque trovato la stafilococco aureo sulla cute nel 23. 8 % dei cani. Ciò potrebbe benissimo spiegare, perchè su 101 papule esaminate l'abbia trovato 9 volte, senza bisogno di sospettare che ve lo avessi inoculato col vaccino filtrato, come a prima vista potrebbe pensarsi.

Di questi stafilococchi, 4 mi fu facile differenziarli dal micrococco aureo non per i semplici loro caratteri morfologici ma assai bene per quelli biologici: il quinto solo si diportò in modo analogo ad esso.

***

Quanto alla ricerca dei piogeni, dai filtrati capaci di dare la pustolosi cutanea, siccome l'esame batteriologico di non pochi di quelli che si erano dimostrati capaci di tale azione, me li aveva fatti ritenere sterili (sebbene non avessi fatte con essi colture in brodo nei sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli) pensai di ricorrere a procedimenti tecnici diversi per vedere se si potesse mettere in evidenza in essi, il micrococco aureo.

Preparai quindi conigli e cani in varie epoche con filtrati vaccinici e salassai gli animali usando tutte le possibili precauzioni perchè il sangue non si inquinasse, e del siero mi servii per le prove sierodiagnostiche sui filtrati stessi,

Ecco come ho proceduto nella preparazione degli animali, i cui sieri mi sono serviti per queste ed altre ricerche, esposte nel lavoro.

1. *Preparazione del coniglio I.* — 19 dicembre 1904. Si vaccina un cane sano con vaccino Pavia.

25 dicembre. Si raccoglie il vaccino che chiamo vaccino canino I, si pesta bene in mortaio di porcellana e di agata, si diluisce con glicerina

(1 di glicerina e 10 di Na Cl al 0.85 %) e si filtra attraverso un'ottima Berkefeld comune già usata e ad una Silberschmidt.

27 dicembre. Si inocula sulla cornea di un solo occhio ed in due conigli il vaccino filtrato.

28 dicembre. Si inocula l'occhio sano di ambedue i conigli col vaccino nè triturato, nè filtrato.

30 dicembre. Mentre l'occhio inoculato col filtrato nulla presenta che fermi l'attenzione, quello inoculato col vaccino presenta già chiarissimo il fenomeno del Guarneri.

Con questo filtrato si procede a trattare un coniglio.

27 gennaio 1905. Si inoculano sottocute cmc. 1 di filtrato ottenuto attraverso una candela Silberschmidt: il coniglio pesa gr. 1260.

30 gennaio. Si inoculano sottocute cmc. 1.5 di filtrato Silberschmidt: il coniglio pesa gr. 1251.

3 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 4 di filtrato Silberschmidt: il coniglio pesa gr. 1205.

5 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 5 di filtrato ottenuto attraverso una Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr. 1280.

11 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 7 di filtrato Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr. 1106.

14 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 10 di filtrato Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr.....

17 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 10 di filtrato Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr. 1170.

21 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 10 di filtrato Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr.....

23 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 10 di filtrato Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr. 1175.

25 febbraio. Si inoculano sottocute cmc. 15 di filtrato Berkefeld *W*: il coniglio pesa gr.....

27 febbraio. Si salassa l'animale e si raccoglie il siero.

2. *Preparazione del coniglio II.* — Si adopera il filtrato del vaccino canino II, ottenuto attraverso una Berkefeld *W* il 9 marzo.

15 marzo 1905. Si inoculano sottocute cmc. 5 di filtrato tal quale.
17 » » » » 5 » »
20 » » » » 6 » »
23 » » » » 10 » »
27 » » » » 10 » »
30 » » Si inoculano sottocute cmc. 5 di filtrato (vaccino concentrato).

2 aprile 1905. Si inoculano sottocute cmc. 6 di filtrato (vaccino concentrato).

21 aprile 1905. Si inoculano sottocute cmc. 12 di filtrato (vaccino concentrato.

26 aprile 1905. Si inoculano sottocute cmc. 10 di filtrato (vaccino concentrato.

9 maggio 1905. Si salassa e si raccoglie il siero.

3. *Preparazione del cane I.* — Si usa il filtrato del vaccino canino II ottenuto attraverso una Chamberland *F* il 13 febbraio, e poi si usano i

filtrati che residuavano, ottenuti attraverso Berkefeld *N*, *V*, *W*, Chamberland *F*, Kitasato, ottenuti il 22 febbraio da vaccino Pavia.

La preparazione del cane seguì in questo modo:

17 febbraio 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 10 di filtrato Chamberland *F*.

21 febbraio 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 15 di filtrato Chamberland *F*.

23 febbraio 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 20 di filtrato Chamberland *F*.

27 febbraio 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 20 di filtrato Berkefeld in parte e Kitasato per il restante.

28 febbraio 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 20 di filtrato Berkefeld e Kitasato.

1° marzo 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 20 di filtrato Berkefeld e Kitasato.

3 marzo 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 30 di filtrato Berkefeld e Kitasato.

6 marzo 1905. Si inoculano sottocute ad un piccolo cane cmc. 30 di filtrato Berkefeld e Kitasato.

7 marzo 1905. Si salassa il cane e se ne raccoglie il siero.

4. *Preparazione del cane II.* — Si usa il filtrato del vaccino canino III ottenuto il 9 marzo da vaccino raccolto il 1° marzo, filtrato attraverso candele Berkefeld *W*, e poi il filtrato del vaccino canino V.

La preparazione del cane seguì in questo modo.

18 marzo 1905.	Si inoculano	sottocute	ad un cane	cmc.	5	di filtrato.
23 »	»	»	»	»	10	»
27 »	»	»	»	»	20	»
29 »	»	»	»	»	10	»
18 aprile 1905.	»	»	»	»	20	»
25 »	»	»	»	»	10	»
30 »	»	»	»	»	20	»

9 maggio. Si salassa e si raccoglie il siero.

Col siero di questi animali ho trattato in tutto 9 filtrati che all'esame batteriologico mi erano risultati sterili e da 3 di essi ho potuto isolare un germe che aveva tutti i caratteri del micrococco aureo.

Di questi 9 filtrati, soli 5 erano però stati sperimentati sulla cute dei cani e vi avevano prodotto la nota pustolosi, ma precisamente in questi 5 rientravano i 3 in cui ero riuscito a mettere in evidenza il germe. Se dagli altri due non ho isolato il batterio, dati i risultati precedenti degli esami batteriologici della cute di cani sani, nulla evita di credere che esso si trovasse sulla cute stessa allorchè venne scarificata col filtrato.

Debbo ancora aggiungere che uno dei tre filtrati da cui non s'era isolato il micrococco, innestato nei sacchetti di collodion contenenti brodo e posti nel peritoneo dei conigli, non aveva lasciato sterile il substrato; ma in questo si era sviluppato appunto lo stesso germe.

Non credo quindi di errare concludendo col dire che *i molti filtrati che dànno senz'altro le pustolosi contengono il micrococco, sia pure soltanto coltivabile nei sacchetti di collodion nel peritoneo dei co-*

nigli, o precipitabile per mezzo del siero di animali inoculati col filtrato, e che, se non lo contengono, è logico ammettere lo trovino sulla cute degli animali, tanto più che essi si isolano dalle pustole e che sulla cute dei cani sani possono rinvenirsi.

Ciò, del resto, spiegherebbe forse perchè si possano avere pustole indipendenti dalle vacciniche, come risulta da alcuni esperimenti già esposti in questa parte del lavoro.

IV.

Resistenza del virus, contenuto nei filtrati, alla triturazione, alla temperatura, ai vapori cloroformici, alle soluzioni forti di Na Cl nel vuoto e su $H^2 SO^4$.

Avendo acquistato la prova che il virus passa attraverso le candele e che il filtrato che lo contiene può trovarsi in pari tempo del tutto privo di batteri, ho cercato di mettere in chiaro le principali proprietà del virus in diverse condizioni ambienti.

1. — *Azione del trituramento sul virus.*

Siccome per ridurre la polpa vaccinica in tali condizioni da passare anche attraverso le Chamberland *B* e le Kitasato, l'avevo sottoposta a successive manovre di triturazione insieme a quarzo e glicerina, che duravano per molto tempo, e, siccome il Santori F. aveva trovato che il vaccino dopo 1 ora e mezzo di triturazione in un mortaio ordinario di porcellana diluito o no con acqua e glicerina, diveniva inattivo sulla cute dei bambini, così ripetei le prove triturando il vaccino insieme a quarzo e a qualche goccia di glicerina nei tre successivi mortai secondo la tecnica da me già descritta, facendo durare la triturazione per 1 ora e mezzo e più. Anche senza riportare gli esperimenti basta leggere quelli sinora eseguiti appunto con vaccino triturato secondo la tecnica descritta per concludere che il virus non si inattiva con la triturazione protratta.

Ad ogni modo il 4 gennaio ho ripetute le prove facendo durare la triturazione precisamente 1 ora e mezzo, in ciascun mortaio, e poi ho inoculato il virus nella cornea di un coniglio. E ancora l' 11 gennaio ho ripetuta la prova con lo stesso materiale triturato ancora per un'altra ora e mezzo. In ambedue gli animali si produssero bellissime ulceri corneali.

I risultati del Santori diventano quindi per me inesplicabili: certo però egli ha sperimentato sull'uomo e non sugli animali, ciò che forse non è lo stesso, perchè, come dirò in seguito, l'uomo di fronte al vaccino non si comporta come il cane ed i bovini.

2. — *Azione del calore sul virus.*

Quanto alla resistenza del virus vaccinico di fronte agli agenti fisici, l'ho studiata, solo in rapporto al calore, nei filtrati ottenuti attraverso candele Berkefeld *W*, sterili all'esame colturale.

Questi filtrati ho posto in tubetti sterilizzati che a loro volta ho collocati in bagnomaria insieme ad un altro tubetto con acqua distillata nel quale immergevo il bulbo di un termometro: un altro termometro veniva posto entro l'acqua del bagnomaria.

Allorchè giudicavo terminato l'esperimento, toglievo i tubi del filtrato dal bagnomaria, li lasciavo raffreddare e subito li inoculavo sulla cute dei cani, scarificata.

Ho messo così assieme 12 esperimenti, gli uni eseguiti coi filtrati di vaccino Pavia e gli altri con quelli di vaccino raccolti dagli ultimi cani che presentarono delle pustole tra quelli inoculati o con filtrati o con polpa vaccinica.

Le temperature a cui ho tenuto i filtrati sono state di 60°, 70°, 80° e 100°; riporto del resto, nella tabella seguente, gli esperimenti eseguiti.

Numero degli esperimenti	Data	Temperatura a cui fu tenuto il filtrato	Durata della esperienza	Vaccino usato	Risultato della inoculazione del filtrato sulla cute dei cani	
					Data	Esitó
1	9 maggio 1905	60°	15′	Vaccino Pavia	12 maggio 1905	Molte pustole.
2	9 id.	60°	30′	Id.	12 id.	Id.
3	9 id.	60°	40′	Id.	12 id.	Id.
4	13 id.	70°	30′	Id.	17 id.	Id.
5	19 id.	70°	60′	Id.	23 id.	Id.
6	13 id.	80°-83°	30′	Id.	17 id.	Qualche pustola.
7	19 id.	80°	60′	Id.	23 id.	Nulla.
8	19 id.	100°	1′	Id.	23 id.	Qualche pustola.
9	13 id.	100°	3′	Id.	17 id.	Nulla.
10	11 giugno 1905	70°	60′	Vaccino canino	15 giugno 1905	Papule e pustole.
11	11 id.	80°	30′	Id.	15 id.	Qualche pustola.
12	11 id.	100°	1′	Id.	15 id.	Id.

È chiaro, che la resistenza alla temperatura, a giudicare da questi esperimenti, che ho cercato di condurre in maniera completa, sacrifi-

cando perciò il materiale che volevo usare per studiarne la resistenza alla luce solare, alla luce diffusa, ecc., risulterebbe press' a poco la stessa di quella che mostra la ordinaria polpa vaccinica.

Essi condurrebbero a ritenere che, tra gli invisibili, il germe del vaccino è tra i più resistenti se non il più resistente.

Non muore infatti dopo esser rimasto esposto alla temperatura umida di 60°, di 70°, di 80° per mezz'ora. Occorre tenerlo 1 ora o press'a poco alla temperatura di 80°-83° e per 3 minuti a 100° per ucciderlo!

Però, come si può dedurre dalla tabella, i filtrati sottoposti alla azione del calore, hanno prodotto delle pustole sulla cute dei cani: Rimaneva quindi il dubbio, dopo quanto ho fatto rilevare sui filtrati che producono la pustolosi, che non già la resistenza del virus vaccinico, ma quella del micrococco piogeno, questi esperimenti rivelassero. Però alcuni fatti s'opponevano ad ammetterlo.

È indiscutibile intanto che i filtrati adoperati erano sterili; ma, anche non lo fossero stati, gli è certo che le prove eseguite l'11 giugno furono fatte con filtrato di vaccino canino nel quale avevano per 6 ore gorgogliato vapori cloroformici secondo il metodo indicato dal Green per la depurazione del vaccino (1), provenienti non dalla soluzione di cloroformio, ma dal cloroformio puro.

In secondo luogo le colture da emulsioni del micrococco, isolato da pustole vacciniche, in glicerina ed acqua diluita a parti eguali o in semplice Na Cl al 0.85 %, in cui avevo fatto gorgogliare i vapori di cloroformio, mi dimostravano che lo stafilococco aureo moriva senz'altro dopo la quarta ora.

Bisogna quindi ammettere che le resistenze trovate alla temperatura erano da attribuirsi al virus e non ai piogeni che eventualmente, si poteva sospettare, si trovassero nel filtrato.

3. — *Azione dei vapori cloroformici sul virus.*

Già nel riferire che avevo sottoposto la polpa vaccinica all'azione dei vapori cloroformici col metodo di Green e che mi ero servito

---

(1) Si opera in questo modo: Si fa un'emulsione di polpa vaccinica nell'acqua distillata in glicerina 1 p., acqua 2 p. nel rapporto di 1 di polpa a 3 di veicolo. Si fa passare quindi, per la durata di 6 ore, dell'aria, la quale prima attraversa una soluzione di cloroformio nell'acqua all'1 per 200, e poi aria soltanto; tra il recipiente contenente l'emulsione e l'acqua cloroformica bisogna intercalare un tubo ad U contenente sabbia o altro materiale per trattenere le eventuali particelle liquide staccatesi dalla soluzione cloroformica (Prelemmary note on the use of cloroform in the preparation of vaccine. *Proc. roy. soc.*, 8 luglio 1903).

di questo mezzo per assicurarmi che il vaccino era sterile di stafilococchi sono venuto implicitamente a render noto d'avere studiato anche il comportamento del virus vaccinico, nel filtrato, di fronte all'azione dei vapori cloroformici.

Non ho però soltanto sottoposto il virus all'azione dei vapori cloroformici secondo il metodo originale del Green, ma anche modificandolo, facendo gorgogliare nel filtrato aria che aveva attraversato del cloroformio puro. Dippiù ancora ho esposto della polpa vaccinica ai vapori cloroformici entro un comune essicatore, in confronto sia con una emulsione di micrococco in glicerina diluita, sia con filtrato.

Ho trovato anzitutto che dopo 6 ore di gorgogliamento dei vapori cloroformici nella polpa vaccinica e nel filtrato, il virus non si inattiva sia che i vapori provengano da acqua cloroformica (cloroformio 1, acqua 200) ,sia da cloroformio puro, mentre il micrococco diviene incoltivabile nei comuni terreni dopo 2 ore e nei sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli dopo 4.

In secondo luogo, esponendo i materiali ai vapori cloroformici in un recipiente chiuso, ho trovato che dopo 24 o 48 ore, le emulsioni di stafilococco divengono sterili, mentre tanto la polpa vaccinica quanto il filtrato, sono ancora attivi dopo questo tempo.

4. — *Azione delle soluzioni concentrate di* Na Cl *sul virus.*

Ho anche voluto vedere se il virus contenuto nelle polpe vacciniche diluite con Na Cl al 0.85 % e filtrate venisse danneggiato dalla soluzione salina, nella concentrazione che si ottiene, riducendo a piccolo volume molti centimetri cubi di filtrato.

Già da qualche esperimento riferito precedentemente con filtrati concentrati emerge il fatto che in queste condizioni il vaccino non si inattiva. Ad ogni modo aggiungerò qui, che fatte le debite proporzioni mi risulterebbe, che il filtrato rimane ancora attivo pur contenendo tra il 10 e il 15 % e fors'anche intorno al 20 % di Na Cl.

5. — *Azione del vuoto su acido solforico a* 40°-50° *C. sul virus.*

Infine, aggiungerò che il virus vaccinico non pare danneggiato dall'azione del vuoto ottenuto con una pompa ad acqua, in presenza di $H^2 SO^4$, purchè però la temperatura ambiente non si elevi per un lungo tempo al disopra dei 45° e raggiunga i 50°-53° C. Infatti mentre un vaccino concentrato in un bagnomaria portato a 45° C si è dimostrato attivo, lo stesso vaccino concentrato in un bagnomaria portato a 50°-53° si è dimostrato inattivo del tutto. Nell'uno e nell'altro caso la concentrazione ha durato 24 ore continue.

6. — *Durata dell'attività del virus nei filtrati.*

Era mia intenzione di praticare una serie di ricerche atte a stabilire la durata dell'attività del virus nei filtrati.

Per mancanza di cani mi sono dovuto, però, limitare a saggiare l'attività di un filtrato di polpa vaccinica, diluita con Na Cl al 0.85 % di circa 7 mesi, sempre sterile, mantenuto in ottime condizioni di conservazione (all'oscuro, a bassa temperatura, entro tubo chiuso alla lampada) e di uno di 3 mesi, posto in condizioni analoghe, ma conservato in tubo chiuso con sola ovatta.

Di più, grazie alla cortesia del prof. Leoni, ho potuto studiare l'attività dei filtrati di vaccini tenuti in ottime condizioni di conservazione da 1, 2, 3, 4, 14, 18 anni.

L'attività dei filtrati è stata sperimentata a mezzo dell'innesto endocorneale, salvo che per il vaccino di un anno e di 18 anni che fu sperimentato anche sulla cute dei cani.

Reputo inutile diffondermi in dettagli: dalla tabella seguente si possono dedurre i risultati.

Data degli esperimenti	Provenienza del filtrato	Età del filtrato	Risultato dell'innesto	
			endocorneale nei conigli	cutaneo nei cani
.. giugno 1905	Vaccino canino	3 mesi	positivo	positivo
Id.	Id.	7 mesi	Id.	negativo
8 aprile 1903	Vaccino Leoni	1 anno	negativo	Id.
8 maggio 1903	Id.	2 anni	Id.	Id.
15 maggio 1903	Id.	3 anni	Id.	Id.
8 maggio 1903	Id.	14 anni	Id.	Id.
10 maggio 1903	Id.	18 anni	Id.	Id.

Risulterebbe dunque da questa tabella che avrei trovato attivo il filtrato di tre mesi, tanto sulla cute dei cani che sulla cornea dei conigli, quello di 7 mesi sulla cornea dei conigli e non sulla cute dei cani. Inattivi si sarebbero dimostrati tanto sulla cute dei cani che sulla cornea dei conigli i filtrati dei vaccini bene conservati di 1-14 anni.

Debbo però notare che nelle cornee inoculate con vaccini di 1-3 anni si sono prodotte lesioni macroscopiche che si assomigliavano molto a quelle che si ottengono coi vaccini poco attivi

(Gorini), con opacamento più o meno marcato della cornea circostante ai punti inoculati. Però si potè escludere la specificità delle lesioni, perchè raschiando le cornee ed inoculando in altre sane il materiale proveniente dalla raschiatura, non si riprodussero.

V.

Ricerche dirette a mettere in evidenza l'agente dell'infezione vaccinica nei filtrati amicrobici.

Attesa la possibilità di ottenere dei filtrati di polpa vaccinica attivi, volli tentare di mettere in evidenza il virus vaccinico nei filtrati stessi.

A dir vero cominciai con eseguire delle ricerche sulla polpa vaccinica: però mi parve subito, che queste ricerche ben difficilmente mi avrebbero condotto ad uno stabile orientamento. Tutte le volte che volli fermare l'attenzione su preparati di essa, fatti a goccia pendente o fissati e colorati, mi trovai nell'impossibilità di emettere un giudizio qualsivoglia sugli elementi che osservavo e che potevano essere sospetti. Più volte ancora, il prof. Leoni ebbe a farmi vedere gocce pendenti di polpa vaccinica con corpicciuoli speciali, corrispondenti ad alcuni di quelli descritti dall'Ishigani (1). Nel vaccino pressato ancora il Santori (2) mi mostrò certi corpicciuoli rotondeggianti, a contenuto omogeneo, non molto rifrangenti, grandi 2-3 volte i comuni stafilococchi, corpicciuoli che trovò anche nei filtrati al carbone attivi e, se non erro, in quelli ottenuti attraverso uno dei calcari che lasciavano passare il bacillo del carbonchio. Mai però riuscii a convincermi di essere in presenza dell'agente dell'infezione vaccinica. Questi corpi anzi mi parve possibile poterli identificare con i *conidii di una streptotricea* che si trova in molti vaccini e che da quello del Leoni ho più volte isolata. La loro semovenza si osserva tanto nei vaccini freschi che in quelli conservati da molti anni ed è legata alla diluizione della glicerina in cui è emulsionata la polpa vaccinica. Essi assolutamente non si trovano nei filtrati ottenuti attraverso le Berkefeld non solo *W*, ma *V*, che pure sono attivi e che producono papule e postule sulla cute dei cani.

---

(1) *U. D. Kultur d. Vaccine.* Centf. f. Bakt., Bd. 31, 1902.
(2) *Filtrazione, diluizione e triturazione del vaccino.* Questi Annali, 1904.

Del pari non saprei qual valore dare alle osservazioni di quegli autori che nei filtrati hanno trovato dei corpi bene visibili per forma e grandezza, e particolarmente alle ricerche del Siegel, sul passaggio nei filtrati di organi e di sangue di conigli vaccinati attraverso le Chamberland, dei *corpi mobili*, rappresentanti uno stadio dell'agente dell'infezione vaccinica, bene visibili per forma e grandezza.

Varie volte ho fatto colture dal succo degli organi, specialmente dalla milza e dal sangue del cuore, di cani e conigli inoculati di vaccino e sempre ho isolato il micrococco aureo più volte ricordato: ho anche spappolato la milza, il timo, e tutto il sangue coagulato di un coniglio dopo cinque giorni dacchè era stato inoculato con vaccino e li ho triturati e filtrati. Mai ho riprodotto la lesione vaccinica, anche concentrando a 30° il liquido filtrato. Ho quindi lasciato andare tutte le ricerche iniziate per vedere se il virus vaccinico esistesse circolante nell'organismo o in qualche organo, ricerche che dovevano in sulle prime costituire una parte del lavoro a sè.

I corpi ovali grandi μ 1 o μ 1.5, contenenti dentro due corpicciuoli cromatici, circondati da una areola chiara, i così detti *corpi iniziali*, che il Prowazek avrebbe trovato nelle cellule corneali accanto ai corpuscoli del Guarneri, corpi che sarebbero forse corrispondenti a quelli che lo stesso autore trova nella linfa vaccinica, fissata con sublimato alcoolico e colorata con l'ematossilina, nei filtrati da me esaminati e colorati nello stesso modo, non sono riuscito a metterli in evidenza.

Dopo ciò, tralascio tutte le ricerche degli altri autori e riferisco senza altro quelle sulle quali ho maggiormente insistito per cercare di scoprire l'agente dell'infezione vaccinica nei filtrati.

A tal uopo ho eseguite indagini col metodo bioscopico del Neisser e Wechsberg ed esami microscopici dei filtrati sedimentati e precipitati.

1. — *Esame bioscopico dei filtrati di vaccino.*

E' noto che il Neisser e Wechsberg trovarono che i leucociti e in genere le cellule viventi hanno potere riducente sul bleu di metilene e che hanno indicato un procedimento per giudicare della vitalità dei leucociti e della sterilità, per esempio del latte, fondato su tale fatto.

Questo metodo io stesso applicai, con risultato, per dimostrare la produzione *in vitro* di una leucolisina da parte del diplococco di Frankel.

Tentai quindi di applicarlo per vedere se nei filtrati di vaccino, assolutamente amicrobici, si trovasse un quid che riducesse la soluzione di bleu metilene e che potesse richiamare l'attenzione sopra l'esistenza dell'agente della infezione vaccinica sui filtrati stessi.

A tal uopo, la tecnica cui dapprima ricorsi, fu quella allora inedita del Mari, il quale aveva applicato il procedimento per ricerche sulle vitalità degli elementi bianchi del sangue e di vari batteri.

Facevo pervenire un po' di liquido filtrato in pipettine sterilizzate con uno degli estremi tirato alla lampada e l'altro fornito di una strozzatura a cui succedeva una svasatura piena di cotone. L'entrata del liquido nella pipettina si otteneva inclinando opportunamente il recipiente e adattando all'orificio di esso l'estremo affilato della pipettina inclinata e quest'entrata si arrestava a 1 cm. dalla strozzatura distaccando la provettina dal liquido. Nello stesso modo si otteneva l'entrata nel tubetto della soluzione di bleu di metilene, avvicinando il beccuccio di una ampollina in cui esso si teneva sterilizzato, all'estremo del tubetto, inclinando tanto l'ampollina quanto il tubetto. Quando la colonnina liquida era giunta a 1 cm. dalla strozzatura del tubetto si distaccava la pipettina dal beccuccio dell'ampollina e si chiudeva l'estremo della pipetta alla lampada. Naturalmente nella pipettina, prima di essere usata, veniva introdotta una goccia di olio di vasellina sterile, il quale, raddrizzando poi la pipetta già riempita di liquido, veniva a galleggiare sulla colonna di liquido stesso. Centrifugando un momento, si otteneva poi la mescolanza della sostanza colorante col filtrato, in modo che il liquido assumeva una tinta celestina uniforme. Dopo di ciò ciascun tubo si poneva nel termostato a 37°.

Naturalmente non si faceva mai una prova sola con ogni filtrato, ma diverse.

Aggiungo ancora che altre prove furono fatte mescolando a gocce entro tubetti il filtrato e la soluzione sterile di bleu di metilene: va da sè che in questi casi si usavano pipette e recipienti del pari sterilizzati e che si cercava di ovviare a tutte le possibili cause di inquinamento.

Risultava intanto dalle prime prove fatte nel 1903 che solo i vaccini attivi decoloravano sicuramente la soluzione di bleu di metilene e che la decolorazione avveniva solo nei tubi nei quali si aggiungevano piccole quantità di filtrato, fatto questo che mi parve allora inesplicabile e mi indusse a non consigliare per il momento di ricorrere al metodo bioscopico per mettere in evidenza nei filtrati germi invisibili e a dire, per riguardo al vaccino, che esso non permetteva di emettere un giudizio qualsivoglia.

In prosieguo però, avendolo ripetuto sui filtrati di manifestazioni sifilitiche, potei convincermi che i filtrati dei sifilomi ulcerati i quali hanno la proprietà di ridurre il bleu di metilene, possono lasciare la soluzione colorata quando la diluizione del materiale viene fatta in glicerina discretamente concentrata.

Mi spiegai allora perchè la riduzione del colore nelle prove fatte coi filtrati vaccinici fosse avvenuta soltanto nei tubi in cui veniva aggiunto poco filtrato, e perciò la ripetei appena mi fu possibile usando filtrati ottenuti attraverso candele Berkefeld *W* di polpa vaccinica diluita con Na Cl al 0,85 %. Ed ottenni i risultati seguenti:

Data	Filtrato di	Rapporto tra soluzione colorante e filtrato		Risultato
		Bleu di metilene	Filtrato	
3 aprile 1905	Vaccino canino	1	1	Scoloramento del fondo in 24 ore
		1	5	Id. di tutto il tubo in 48 ore
7 maggio 1905	Vaccino Pavia.	1	1	Id. id. in 36 ore
		1	5	Id. id. in 24 ore
11 giugno 1905	Vaccino canino	1	1	Id. di $^1/_2$ del tubo in 24 ore
		1	5	Id. di tutto il tubo in 24 ore
11 id.	Vaccino dell'Istituto sieroterapico milanese esistente nell'Istituto di Cagliari almeno da un anno.	1	1	Nessuno scoloramento.
		1	5	
		1	10	

Non evvi quindi alcun dubbio che i *filtrati di vaccino attivo riducono la miscela colorante del Neisser e Wechsberg e che quelli di vaccino inattivo non la scolorano.*

Ciò vuol dire che nei filtrati dei vacini attivi, deve esistere un *quid* che riduce il bleu di metilene. Che sia però il virus vaccinico non è lecito affermarlo, perchè nella polpa vaccinica si trovano e batteri ed elementi cellulari dai quali possono esser prodotte o estratte (la polpa vaccinica venne sempre prima bene triturata, non bisogna dimenticarlo, e poi diluita con Na Cl al 0,85 %) sostanze riducenti che passano attraverso la candela.

Gli esami microscopici del liquido scolorato, pensai per un momento potessero farmi risolvere la questione, ma trovai non poca difficoltà atteso l'olio di vasellina esistente sulle colonnine, a fare preparati a gocce pendenti, prive di esso. Potevo è ben vero ripeterle col metodo Mari esaminando ciò che rimaneva al fondo delle pipettine dopo rottura dell'estremo affilato; ma, un po' perchè non possedevo un'adatta centrifuga, un po' perchè già avevo eseguite le ricerche, che ora esporrò, sui filtrati sedimentati e precipitati, mi limitai ad assodare il fatto, per non perdere un tempo prezioso in altri dettagli tecnici.

2. — *Esame microscopico dei filtrati di vaccino.*

Le indagini microscopiche sui filtrati le ho fatte tutte su quelli ottenuti attraverso candele Berkefeld W, sopra filtrati ottenuti attraverso una Silberschmidt, una Chamberland *F*, una Kitasato. Usando i filtrati ottenuti attraverso le Berkefeld, mi sono servito tanto di quelli coi quali avevo provocata la più volte descritta papulosi cutanea sulla cute dei giovani cani, quanto di filtrati coi quali avevo senz'altro ottenuto la pustolosi.

Questi filtrati, ho esaminati a fresco per mezzo di gocce pendenti e colorati per mezzo di preparati fissati e colorati. Li ho esaminati dapprima subito appena ottenuti e in seguito lasciandoli sedimentare per 8-15 giorni in tubetti sterili, avendo assoluta garanzia di avere evitati postumi inquinamenti: ho anche tentato di favorire questa sedimentazione per mezzo della centrifugazione, sebbene i mezzi di cui disponevo a Cagliari fossero poco adatti. Finalmente ho altresì fatto agire sui filtrati stessi, siero di cane e di conigli ripetutamente inoculati con filtrato vaccinico.

Le gocce pendenti sono state fatte con vetrini sterili e vasellina sterile dentro la cameretta asettica e osservati subito o dopo esser state in termostato almeno 24 ore. I preparati colorati si sono eseguiti dopo avere fissato il materiale alla fiamma, nell'alcool assoluto, nell'alcool ed etere, nel sublimato acetico, e negli ultimi tempi nell'acido fosfowolframico e nell'alcool secondo il metodo indicato dal Retzmann (1) per la fissazione dello *spirochaete* di Schaudinn e Hoffmann. La colorazione del materiale l'ho fatta a caldo e a freddo con fuxina carbolica, con bleu di Löffler, con tionina fenica, con violetto di Ehrlich e più recentemente con l'azzurro II (0,8 % p. 1) e l'eosina A G (1 su 20,000 p. 10) tenendo i vetrini immersi nella soluzione per 1-24 ore.

Il materiale che servì per fare i preparati venne, se proveniente da vaccino filtrato da poco, prelevato con l'ansa di platino e steso su vetrini coproggetti sgrassati, lavati e sterilizzati; se, proveniente da vaccino lasciato sedimentare o precipitato, dal fondo dei tubetti stessi, dopo avere, con pipetta capillare tirata alla lampada, aspirata tutta la colonnina liquida sin presso al fondo del tubetto stesso.

I risultati di queste osservazioni microscopiche li riassumo nei seguenti paragrafi.

A) *Esami microscopici dei filtrati appena ottenuti.*

Per mezzo dei preparati a goccia pendente, nei filtrati attivi, capaci di produrre la papulosi, non mi è riuscito trovare alcun corpo che fermasse la mia attenzione: in quelli capaci di produrre la pustolosi, notai spesso, ma non sempre, qualche corpicciuolo sferico e qualche volta due corpicciuoli tra di loro accoppiati. Attesa la grandezza di questi elementi, il modo di comportarsi verso i reat-

(1) *Zur Farbung der Spirochaete pallida Schaudinn.* Deutsch. med. Woch., 1905, p. 997.

tivi coloranti e il fatto che questi filtrati posti nei sacchetti di collodion entro il peritoneo di conigli, divengono ricchi di forme cocciche, questi corpicciuoli, per me, non sono che cocchi.

Per mezzo di preparati colorati, negli stessi filtrati, ove come mezzo di filtrazione ci si serva delle fiamma o dell'alcool assoluto o dell'etere o del sublimato acetico, e poi dopo gli opportuni lavaggi quando necessitino, come mezzi coloranti, delle comuni soluzioni aniliniche, di fuxina, di bleu di metilene, di violetto di genziana, non si riescì a scoprire alcuna forma che potesse fermare l'attenzione tanto come costanza di reperto, quanto come abbondanza dello stesso.

B) *Esami microscopici dei filtrati sedimentati.*

E' necessario anzitutto dica, che lasciando sedimentare certi filtrati sterili, si forma un deposito fino, polveroso, spesso anche aderente a quella parete del tubo ch'è inclinata, deposito che prelevato nel modo descritto, ed esaminato direttamente in goccie pendenti al microscopio, non permette neanche con fortissimi ingrandimenti, (Ocul. 12-18 comp. e obb. immers. omogenea apocr. 2 mm. 1,30 ap. num. Koriska) di rilevare la morfologia del materiale di cui è costituito. Si intravede una specie di poltiglia nel campo microscopico, ma non si saprebbero definire gli elementi che la costituiscono.

Deponendo il materiale su vetrini coproggetti e fissandolo alla fiamma, o nell'alcool assoluto o nell'alcool ed etere e poi colorandolo con la fuxina, con il bleu di metilene, coll'azzurro II, pure notando che il vetrino assume una lieve tinta bluastra, tuttavia sottoposto questo all'esame microscopico, non è possibile farsi un concetto esatto se vi sia del materiale colorato, anche servendosi dei più forti ingrandimenti di cui oggidì si possa disporre.

Soltanto colorando, dopo fissazione con alcool assoluto per 10 minuti, con la miscela di azzurro II ed eosina, già dopo 1 ora, si estraggono i vetrini dal colore, nettamente colorati in bleu-violetto, e sottoposti all'esame microscopico, si vedono delle zolle di materiale bleu appena percettibili sul fondo trasparente e incolore il vetrino, zolle che certamente stanno ad indicare la presenza di un materiale che non si è potuto mettere bene in evidenza per mezzo della colorazione.

Quando però dopo la fissazione in alcool per 10 minuti si fa seguire il passaggio in acido fosfowolframico al 2 % per 5 minuti e dopo lavaggio in acqua distillata, si ripete la colorazione con l'azzurro II e l'eosina o anche con la semplice fuxina fenica, si co-

lora un *detrito finissimo che sembra costituito da granuli di diversa grandezza a contorni non bene definibili, riuniti in ammassi più o meno grandi, detrito che impone anche per la sua costanza e per la sua abbondanza.*

C) *Esami microscopici dei filtrati precipitati con siero di animali sottoposti ad un trattamento immunizzante coi filtrati stessi.*

Queste prove le ho eseguite nel febbraio e marzo 1905 col siero dei cani e conigli inoculati coi filtrati salassati a guarigione della lesione cutanea, in confronto con il siero di cane e coniglio sano. Ecco i risultati degli esami macroscopici esposti in una tabella.

Data	Siero di	Filtrato		Risultato delle prove rilevato dopo 24 ore di dimora in termostato
		di	ottenuto attraverso una candela	
23 febbraio 1905.	Cane sano	Vaccino canino	Silbersemidt	Nulla.
23 Id.	Cane sano	Id.	Id.	Nulla.
3 marzo 1905 .	Cane I trattato	Vaccino canino III	Berkefeld W.	Leggero precipitato bianco polveroso fioccoso.
3 Id.	Coniglio I trattato	Id.	Id.	Id.
3 Id.	Coniglio sano	Id.	Id.	Nulla.
6 Id.	Coniglio I trattato e riscaldato a 56° per ½ ora.	Id.	Id.	Deposito appena percettibile.
6 Id.	Cane I trattato e riscaldato a 56° per ½ ora.	Id.	Id.	Nulla.
15 Id.	Coniglio vaccinato il 2 marzo 1905 e salassato il 9 marzo 1905.	Vaccino canino IV	Id.	Id. anche dopo 3 giorni.

Risulta dunque da questo quadro, *che i cani inoculati ripetutamente con filtrato vaccinico, forniscono un siero che aggiunto ai filtrati determina un precipitato senza intorbidare il liquido* **e che tale azione non ha il siero quando venga riscaldato a 56° per 30 minuti. Il siero dei conigli trattati ha la stessa azione sui filtrati, ma molto meno**

evidente: essa ad ogni modo permane, sebbene appena percettibile, anche se il siero si scalda a 56° per 30 minuti. Il siero dei conigli vaccinati non ha questa proprietà.

Contemporanee ricerche eseguite con sieri di coniglio e cane (inoculati con filtrati di manifestazioni sifilitiche) sui filtrati di queste stesse manifestazioni, non mi hanno condotto a osservare un reperto analogo. Quando si noti che le prove eseguite dimostravano tutte (Klingmüller e Baermann, Metschnikoff, Casagrandi e De Luca), che il virus sifilitico non passa attraverso le candele, questi esperimenti costituiscono, a mio vedere, degli eccellenti controlli agli esperimenti col vaccino. D'altra canto trattando pus triturato e diluito con Na Cl al 0.85 %, filtrato, col siero che avevo aggiunto ai filtrati vaccinici, non ho ottenuto lo stesso reperto. E lo stesso si dica quando ho mescolato il siero del cane immunizzato con il micrococco, ai filtrati vaccinici (esperimenti eseguiti nel giugno 1905). Naturalmente ho anche fatte prove di controllo con i soli sieri diluiti con acqua distillata o con Na Cl al 0.85 % nelle stesse proporzioni, nelle quali i sieri venivano nelle mescolanze, diluiti dai filtrati. Qualche volta ho osservato come un lievissimo deposito nei sieri diluiti, ma il fenomeno nulla a che vedere con quello osservato mescolando ai filtrati stessi siero di cane trattato e filtrato vaccinico.

D'altro canto ho innestato sulla cute di un giovanissimo cane uno dei depositi di vaccino: su 18 scarificazioni, 18 si sono in seconda giornata presentate rilevate arrossate e due si sono in 3 giornate coperte di pus e poi di crosticine. E finalmente ho innestato ancora una cornea di coniglio con lo stesso materiale: 3 sono stati i punti inoculati secondo la tecnica originale del Guarneri. In tutti e 3 i punti, in terza giornata, si sono formate delle ulcere a fondo limpidissimo però, circondate da un aloncino appena appena appariscente. Queste cornee furono a suo tempo, dopo fissate col metodo di Retzmann, sezionate e colorate.

Dei *cythorycles* ne furono trovati pochissimi, ma colorando con l'azzurro II e l'eosina, *il reperto che si trovò fu identico a quello osservato nelle cornee inoculate con filtrati fissate e colorate con questo procedimento*, *reperto che richiama quello osservato nei filtrati sedimentati e precipitati.*

Tali ricerche portano quindi a concludere *che nei filtrati di polpa vaccinica si possono mettere in evidenza dei piccolissimi elementi di apparenza detritica*, *previa fissazione col metodo di Retzmann*, *elementi male definibili per forma e grandezza.*

Che essi costituiscano ammassi del germe e che ciascuno elemento degli ammassi a sua volta risulti dalla riunione di diversi germi, io non potrei precisare: dirò soltanto che considerando la possibilità di poter ottenere dei filtrati ancora attivi, attraverso le

Chamberland *B* e le Kitasato, quest'ultima circostanza potrebbe anche essere accettabile.

Comunque anche non volendo ammettere che questi ammassi siano costituiti dal germe dell'infezione vaccinica, è innegabile che esso vi si deve trovare, dal momento che inoculandoli nel cane e nel coniglio riproducono le lesioni vacciniche.

Anche i reperti osservati tra le cellule ed entro le cellule delle cornee inoculate coi filtrati e col loro deposito, fissate col metodo di Retzmann e colorate coll'azzurro II e l'eosina, reperti che si avvicinano se non addirittura si identificano con quelli dei sedimenti e dei precipitati dai filtrati, *parlano in favore della interpretazione parassitaria degli elementi costituenti gli ammassi più volte ricordati.*

Quanto alla natura dell'agente dell'infezione vaccinica, non fosse altro tenendo presente la resistenza che mostra di fronte alla temperatura, *resta un po' difficile riferirla a quella di un protozoo*, d'accordo in ciò col Prowazek, il quale contro tale ipotesi fa risaltare l'uniformità con la quale in tutti gli stadi di evoluzione della lesione vaccinica corneale, cioè da 8 a 336 ore, il materiale che vi si contiene è sempre ugualmente attivo. Comunque, non è mio intendimento di pronunziarmi sul riguardo: le ricerche sui virus filtrabili sono ancora troppo addietro per potercisi orientare con sicurezza. Il sospetto del resto, che nel filtrato passi il virus in uno degli stadi di sviluppo del parassita, non può così alla leggera, dopo quanto è stato scritto sul ciclo di sviluppo del parassita vaccinico a torto o a ragione da vari autori, scartarsi, senza ulteriori e più minute ricerche.

Voglio soltanto insistere su questo, che i comuni batteri, e particolarmente il piccolo cocco che si trova in alcuni filtrati e che anche di recente ha trovato il Ronget (1), in uno di essi ottenuto attraverso le Berkefeld *V*, non ha che vedere con gli elementi su cui ho fin qui fermata l'attenzione. Questo piccolo cocco del Rouget forse non è che il *micrococco aureo* da me isolato dal virus vaccinico, nonchè da molti filtrati che producono lesioni pustolari, da cui nelle ordinarie condizioni è incoltivabile, e che ha tanti caratteri se non tutti, del micrococco aureo isolato dal Sanfelice e Malato dagli individui vaiolosi. Per la sua piccolezza, per la sua capacità di dare lesioni pustolari sulla cute dei cani, per la sua natura batterica cui naturalmente si lega quindi una notevole resistenza al calore, per il fatto che esso inoculato nelle vene dei cani può restare senza azione se gli animali sono stati prima inoculati di vaccino, è certo

(1) Loco citato.

che esso a prima vista potrebbe credersi l'agente etiologico dell'infezione vaccinica e pensarsi che gli ammassi detrici siano ammassi di cocchi, ma oltre ai numerosi fatti che si oppongono ad attribuirgli questo significato e che ho già riferito e discussi, va aggiunto che il reperto microscopico dei filtrati, sedimentati e precipitati, non ne rivela la presenza, sempre però che si tratti di filtrati attivi sì ma assolutamente sterili nei comuni terreni, nei sacchetti di collodion ed incapaci di dare lesioni pustolari.

Io non potrei citare che due soli esperimenti con un filtrato *W* sottoposto all'azione del cloroformio per 6 ore col metodo Green, che mi avrebbe dato pustole senza che da esse avessi potuto isolare il cocco; ma questo non può parlare, essendo tante le cause d'errore, in favore della produzione di vere pustole per opera del solo agente dell'infezione vaccinica, o, se si vuole ne parli, è per negare che la pustolosi vaccinica sia dovuta al cocco più volte ricordato.

Conclusioni.

Le ricerche esposte nel presente lavoro conducono a diverse conclusioni che, messe in rapporto ai fatti dai quali derivano, è possibile distinguere in 3 gruppi.

A) *Filtrabilità del virus vaccinico.*

I. Il pus vaccinico pressato a 300-500 atmosfere diluito o non in glicerina e acqua (1:2-1:3) o in Na Cl al 0.85 per cento, filtrato attraverso candele Berkefeld comuni, pur non producendo alcuna lesione, se inoculato sulle cuti di giovani cani, può immunizzarli contro l'inoculazione di pus vaccinico non filtrato, eseguita dopo la guarigione delle lesioni cutanee prodotte dallo strumento scarificatore.

II. L'immunità ottenuta nei cani coll'inoculazione di filtrato del vaccino, assolutamente sterile all'esame batteriologico, si ha però soltanto verso l'infezione vaccinica determinata dal vaccino commerciale attivo, ma che all'esame batteriologico risulta privo di stafilococchi coltivabili, non contro quella che è determinata da vaccino contenente stafilococchi coltivabili sia pure soltanto in brodocolture fatte in sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli.

III. Il pus vaccinico bene triturato, insieme a quarzo ed a glicerina, in mortaio di porcellana e d'agata, macinato in mortaio metallico, e poi filtrato attraverso candele Berkefeld comuni, *V*, *N*, *W*, grandi e piccole, Chamberland *F* e *B*, Kitasato, Silberschmidt, se

inoculato sulla cute di giovani cani può nei punti scarificati produrre papule, che bene spesso evolvono in pustole non differenziabili da quelle vacciniche: nei cani in cui si producono sole papule, come in quelli che si producono pustole, la rivaccinazione con pus vaccinico attivo non ha alcun risultato.

IV. Dai filtrati che producono pustole vacciniche sulla cute dei cani può isolarsi, alcune volte nei comuni terreni, nelle colture in brodo nei sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli, un piccolo cocco aureo che si isola anche dalle pustole più spesso vacciniche e che per i suoi caratteri risponderebbe al micrococco aureo isolato dal Sanfelice e dal Malato dai vaiolosi.

V. I filtrati che producono sole papule sulla cute dei cani risultano, all'esame batteriologico, costantemente sterili; la ricerca del micrococco aureo ha un risultato negativo; d'altro canto i comuni micrococchi aurei che si isolano dalla superficie di alcune papule non sono più frequenti di quelli che si isolano dalla cute dei cani sani.

VI. I filtrati di vaccini assolutamente amicrobici, inoculati nelle cornee dei conigli, producono un'ulcera corneale che ha tutti i caratteri di quella descritta dal Guarnieri in seguito all'inoculazione endocorneale di polpa vaccinica; nelle cellule corneali però è raro in massima il reperto dei *cythoryctes* che è così caratteristico nelle cellule delle cornee inoculate con polpa vaccinica non filtrata.

VII. La papulosi e la pustolosi, che si producono sulla cute dei cani coll'inoculazione dei filtrati, sono trasmissibili in serie da cane a cane, ed anche la lesione corneale prodotta dagli stessi filtrati è trasmissibile da cornea a cornea di coniglio: però la trasmissibilità da cornea a cornea della lesione ottenuta coi filtrati che assolutamente non contengono il micrococco aureo, non si è potuta osservare al di là di una decina di passaggi, mentre in quelli che lo contengono, sia pure senza che si coltivi nei comuni terreni, si è ottenuta per un numero indefinito di passaggi come con la polpa vaccina non filtrata.

B) *Resistenza del virus vaccinico.*

VIII. La resistenza del virus vaccinico nei filtrati assolutamente amicrobici, alla temperatura di 60°, 70° 80, 100° C. è pressochè quella della polpa vaccinica; il filtrato diviene inattivo dopo 1 ora a 80° e 3′ a 100°: *il germe del vaccino è quindi molto più resistente degli altri virus filtrabili finora conosciuti.*

IX. Si può escludere che la resistenza del germe vaccinico risponda a quella del piogeno che si trova nel pus vaccinico e che può passare eventualmente nei filtrati, dacchè ugualmente si diportano quei filtrati, d'altronde del tutto amicrobici, sottoposti all'azione dei vapori di cloroformio per la durata di 6 ore, secondo il metodo del Green per depurare il vaccino dai germi non sporigeni, metodo che realmente serve a liberarlo dal micrococco aureo.

X. Il virus vaccinico resiste ancora più di 24 ore in ambienti intorno ai 40°, se venga sottratta l'aria col vuoto, e venga concentrato il filtrato sino a piccolo volume su $H^2 SO^4$, sebbene la concentrazione del Na Cl dal 0. 85 % salga intorno al 10 e al 20 %.

XI. I filtrati, tenuti all'oscuro e a temperatura ordinaria, sono ancora attivi sulla cornea dei conigli fino a circa 7 mesi, sulla cute dei cani fino a 3, mentre i filtrati di vaccini ben conservati da 1-2-3-14-18 anni sono del tutto inattivi.

XII. Il virus vaccinico triturato per più ore, insieme a quarzo e glicerina non si rende inattivo: dopo un'accurata triturazione durata varie ore è possibile ottenerlo ancora attivo anche se diluito nelle proporzioni di 1 a 100, 1 a 300 con Na Cl al 0. 85 % e filtrato attraverso le candele più porose.

C) *Indizi sull'esistenza del germe dell'infezione vaccinica nei filtrati, dedotti dagli esami bioscopici e microscopici dei filtrati stessi non contenenti il micrococco aureo, nè alcun batterio.*

XIII. Non è possibile nella polpa vaccinica grezza dimostrare elementi bene differenziabili e visibili che con sicurezza debbano considerarsi i parassiti della infezione vaccinica: alcuni corpi sferici, rifrangenti, comuni a trovarsi in alcuni vaccini, vanno considerati come conidi della streptotricea che di solito vi si trova: gli altri corpi, ritenuti specifici dell'infezione vaccinica, non passano nei filtrati, a meno, forse, di non usare forti pressioni o candele molto porose; essi non si trovano nei filtrati da me ottenuti attraverso le Berkefeld *W*, Silberschmidt, Chamberland, assolutamente amicrobici, ma attivi.

XIV. Nei filtrati di vaccino attivo, sterili, si riesce col metodo bioscopico del Neisser e Wechsberg a mettere in evidenza un *quid* capace di ridurre la soluzione di bleu di metilene, *quid* che manca nei filtrati di polpa vaccinica inattiva; non si può però affermare che esso sia rappresentato dall'agente dell'infezione vaccinica, perchè la polpa vaccinica contiene e cellule e leucociti e batteri, dai quali

non si può escludere si possano liberare o produrre sostanze riducenti la soluzione del Neisser e Wechsberg, e capaci di attraversare il filtro.

XV. Nei filtrati, assolutamente amicrobici, di vaccino lasciati sedimentare o precipitati con siero di cani e conigli trattati coi filtrati stessi, col metodo del Retzmann per la fissazione dello spirochete di Schaudinn ed Hoffmann e successiva colorazione con l'azzurro II e l'eosina o con la fuxina, si riesce a mettere in evidenza un detrito granulare i cui elementi, male distinguibili per forma e grandezza, non è possibile stabilire se risultino di un solo corpo o di più corpi riuniti insieme.

XVI. Siccome gli stessi risultati non si ottengono nè dai filtrati di sifilomi con l'aggiunta di sieri di conigli trattati coi filtrati stessi (nei quali si sa non passare il virus sifilitico), nè dai filtrati di pus con l'aggiunta dei sieri dei conigli vaccinati coi filtrati di vaccino, e neppure dai soli sieri diluiti o no, il materiale detritico messo in evidenza col metodo di Retzmann potrebbe assumere un valore, in certo modo, specifico.

XVII. Siccome, poi, un reperto analogo se non identico si può mettere in evidenza nelle cornee inoculate coi filtrati di vaccino che non contengono il micrococco aureo, e si possono riprodurre con questi sedimenti l'ulcera corneale e la lesione papulare cutanea sulla cute dei cani, si ha grande probabilità che gli ammassi così abbondanti e costanti nei filtrati sedimentati e precipitati siano costituiti dal germe del vaccino, o almeno si deve ammettere, che questo germe si trovi in essi.

XVIII. Non si può con sicurezza precisare la natura del virus vaccinico; certo parrebbe trattarsi di un germe molto piccolo (dacchè può passare anche attraverso le Chamberland *B* e le Kitasato, in buone condizioni di triturazione della polpa vaccinica), e di un germe che, data la sua notevole resistenza alla temperatura, conformemente alle conclusioni del Prowazek, è ancora assai difficile ammettere sia di natura protozoica. Comunque sul riguardo non intendo esprimermi in modo definitivo.

Dopo di che mi credo autorizzato ad affermare che *il germe del vaccino passa non solo attraverso alle Berkefeld* V *ed* N, *ma anche alle comuni e alle* W, *alle Silberschmidt*, *alle Chamberland* F *e persino alle* B *alle Kitasato*, *e che esso passa in condizioni da potersi probabilmente dimostrare nei filtrati sedimentati o precipitati e fissati col metodo di Retzmann, e da essere capace di produrre nei cani lesioni cutanee indifferenziabili da quelle vacciniche*, *nonchè una lesione ulcerosa nella cor-*

nea dei conigli, identica a quella che produce il vaccino non filtrato, le une e le altre trasmissibili in serie.

N.B. Altre ricerche sui rapporti tra l'azione del virus e quella di un particolare micrococco aureo che si trova nel contenuto delle pustole vacciniche e quelle sull'eventualità di sostituire nella vaccinazione antivaiolosa i filtrati di pus vaccinico alla polpa vaccinica ordinaria, formeranno oggetto di altra memoria nella quale troveranno anche posto i raffronti tra questo micrococco e quello isolato dal Sanfelice e dal Malato dai vaiolosi, giacchè alla cortesia del primo devo, da questo novembre, una coltura del germe.

Quanto ai risultati degli esami istologici delle cornee inoculate coi più diversi filtrati, con i vari germi isolati dalla polpa vaccinica e dalle pustole, saranno riferiti, come ho già detto, in un altro lavoro che uscirà dal mio Istituto.

Istituto d'Igiene della R. Università di Messina

Sui bacilli acidoresistenti

per il dott. **P. LOMBARDO PELLEGRINO,** assistente volontario.

Lo stato delle nostre conoscenze, intorno alla questione dei bacilli resistenti agli acidi o pseudotubercolari, malgrado una ricca letteratura, è ancora imperfetto, e poco si sa intorno alle loro proprietà biologiche, morfologiche e patogenetiche, e meno ancora, intorno alla loro natura e ai rapporti fra loro e con gli altri bacilli.

Si comincia già con avere una variata sinonimia di tali bacilli: bacilli della pseudotubercolosi, bacilli acidofili, paratubercolibacilli, bacilli tubercoloidi, ecc., e finalmente in maniera più propria e più generalmente adottata: *bacilli acidoresistenti.*

Numerosissimi sono gli acidoresistenti descritti, ma relativamente pochissime sono le forme tipiche.

Una esposizione completa e quasi didattica, di tutti gli acidoresistenti conosciuti sino al 1902, è stata fatta da Potet (1) — e sarebbe opera sterile rifarla: — solo a complemento della pubblicazione del Potet, credo doveroso riferire alcuni lavori posteriori.

Rappin e Heurot (2) nei prodotti di raschiamento del sifiloma, di placche mucose, ecc., dicono d'aver constatato la presenza di un bacillo acido-resistente, identico a quello di Lustgarten, scoperto da questi nelle stesse lesioni.

Questo bacillo sarebbe stato trovato egualmente nelle urine di parecchi sifilitici (3 su 7) e in questi casi si trattava di malati al principio o in pieno decorso di reinfezione.

Il valore di questa comunicazione è relativo, per la ormai stabilita identificazione del bacillo di Lustgarten con quello di Alvarez e Tavel, e per le recenti scoperte di Schaudinn e Hofmann.

De Simoni (3) ha trovato acidoresistenti, nel secreto delle otiti medie purulente croniche, nel secreto ozenatoso, e insieme con Rovida (3-*bis*), nella patina dentale e nella saliva degl'individui sani.

Beck (4) recentemente (1905) descrive due nuovi acidoresistenti, che chiama tubercoloide I e II.

Il *bacillo tubercoloide I* fu trovato dall'A. accidentalmente, mentre fa-

ceva ricerche su bacilli tubercolari di diverse provenienze, e fra le altre cose inoculò in cavie il burro del mercato.

I bacilli trovati sono più lunghi del bacillo tubercolare e acuminati e in parte scoloriti.

Nelle culture in agar-glicerinato, siero di sangue e brodo, tali bacilli non producono pigmento.

Il bacillo tubercoloide I è immobile, nelle culture fresche esso si colora di preferenza secondo il metodo Koch-Ehrlich. Nelle vecchie culture esso è accessibile alle soluzioni comuni coloranti, come sarebbero fuchsina fenica allungata, violetto di genziana, bleu di metilene, ecc.

Esso prende queste soluzioni coloranti lentamente e appare disugualmente colorato; il bacillo internamente appare come se fosse costituito da piccoli granuli. Prende il Gram. Non ha ramificazioni.

Sull'agar glicerinato, dopo 2-3 giorni a 37 vedesi una patina bianca, spessa, la quale dopo il 5° giorno raggiunge il massimo del suo sviluppo e appare pieghettata e increspata. Dopo 12 giorni circa, si increspa sempre più e assume l'aspetto della cultura di vero bacillo tubercolare: l'acqua di condensazione viene coperta da una pellicola che nuota su di essa, e in seguito aderisce anche alle pareti del vetro. La patina aderisce fortemente al terreno di cultura e si fa togliere a grandi pezzetti.

Su patata cresce bene. Su gelatina scarso sviluppo, non la fluidifica. Su terreno di cultura privo di albumina lo sviluppo del bacillo non è rigoglioso.

E' particolare l'odore della cultura di trimetilamina, che si può sentire nelle culture di brodo di 3-4 giorni e propriamente nella tubercolina generata dalle culture in brodo evaporizzate.

Bacillo tubercoloide II. — Il 2° bacillo acidoresistente di Beck, fu isolato da la membrana tonsillare di una donna morta per tubercolosi.

Questi bacilli trovati in grumi aderenti alle tonsille, erano di 2 specie: alcuni corti e aggruppati, altri lunghi che giacevano isolatamente e non uniti fra loro: questi ultimi conservavano la colorazione rossa.

La morfologia del bacillo è quella di un simildifterico — è immobile — resiste agli acidi — prende il Gram.

E' aerobio obbligatorio — sviluppa a temperatura di stanza, meglio a 37° — non liquefà la gelatina — non produce indolo — non sporifica.

Cresce come i veri bacilli tubercolari sul siero di sangue e su terreno nutritivo contenente glicerina.

In agar glicerinato presenta una patina bianco-sporca, spessa, increspata, umida, mamellonata, con margini sinuosi e irregolari — talora si presenta pieghettata.

In brodo lo intorbida uniformemente al 5° giorno, formando in seguito un sedimento, senza che il brodo diventi perfettamente chiaro.

Come il precedente, in mezzi privi di albumina, il bacillo non vegeta rigogliosamente.

Esponendo in ordine cronologico e per nome di autori, in quadro riassuntivo, tutti gli acidoresistenti trovati e descritti sin oggi, si ha la tavola seguente: — giova ripetere però che le forme tipiche, sono poche; come pure non tutti gli autori, hanno isolato e coltivato, il pseudotubercolare o acidoresistente che hanno descritto.

Tabella espositiva degli Acidoresistenti.

Anno	Habitat			
	Latte e burro	Natura	Animali	Uomo sano e malato
1896	Koch-Petri (5)			
1897	Rabinowitsch (6)			
1898	. . . .	Moeller (21) (Gras-bac. I)	Moeller (21) (Mist-bac.)	
1899	Korn (7) I	Moeller (21) (Gras-bac. II)	. . . .	Moeller (21)
»	» II			
»	Herbert (8)			
»	Rubner (9)			
»	Obermüller (10)			
»	Hormann (11)			
»	Morgenroth (12)			
»	Coggi (13)			
»	Gardenghi (14)			
»	Grassberger (15)			
1900	Beck (16)			
»	Carnevali (17)			
»	Santori (18)			
1901	Tobler (19) I	Herr (24). . . .	Moeller (21) (Bacillo della tubercolosi bovina) .	Karlinski (25).
»	» II			Stolz (26).
»	» III			Dietrich (27).
»	» IV			Laser-Czaplewcki (28).
»	» V			Mironescu (29).
»	Markl (20)			Flexner (30).
»	Moeller (21)			Pappenheim (31).
»	Jong (22)			
1902	Binot (23) . . .	. . . .	. . . .	Rabinowitsch (32), Folli (33).
1903	. . . .	. . . .	. . . .	De Simoni (3), Rappin e Heurot (2).
1904	. . . .	. . . .	. . . .	De Simoni e Rovida (3bis).
1905	Beck (4) . . .	. . . .	. . . .	Beck (4).

A questa lista già così numerosa di *acidoresistenti* bisogna aggiungere quelli isolati nell'Istituto d'igiene della R. Università di Messina, e da me studiati.

Non parrebbe possibile, data così grande ricchezza di materiale, potere descrivere ancora forme nuove, ma quando si pensa che ogni ricerca metodica è quasi sempre fertile di risultati, essendo tali bacilli più diffusi nell'ambiente di quello che si creda comunemente; — e d'altro canto quando si pensa che solo per mezzo dell'analisi accurata di una quantità rilevante di bacilli acidoresistenti a noi può derivare qualche luce sulla natura di questi germi; si vede che vale la pena di descrivere accuratamente gli acidoresistenti trovati e coltivati.

Acidoresistente I.

E' stato trovato dal dott. Guargena nelle feci dei lombrici e da lui e da me nel terreno in cui questi vermi vegetavano.

Forma. — E' un bacillo piccolo, ma più grosso e più lungo del bacillo della tubercolosi di Koch, talora in forma di corto filamento, più o meno curvo, di cui qualcuno brevemente ramificato. Il protoplasma dei bacilli è grossolanamente granuloso e le estremità sono translucide; — il bacillo non presenta una membrana molto evidente, ma i suoi contorni presentano una piccola zona translucida. Le estremità del bacillo sono uguali, e non si vedono forme a clava. Esso ordinariamente assume un aspetto tozzo, talora di bastoncello rigido, più spesso alquanto irregolarmente incurvato.

Le ramificazioni quando ci sono, non sono molto lussureggianti e lunghe, ma corte e si staccano ad angolo acuto dal filamento principale. Le forme filamentose si trovano più frequentemente nelle vecchie culture su agar glicerinato.

Disposizione. — Il bacillo è raramente isolato, più spesso è a gruppi, ma senza particolare disposizione.

Caratteri biologici. — Il bacillo è immobile, aerobio, non liquefà la gelatina, non coagula il latte, non presenta la reazione dell'indolo, non si osserva sporificazione. Sviluppa a temperatura di stanza, *optimum* a 37. Produce in cultura un pigmento rosso corallo.

Comportamento con i colori. — Resiste alla decolorazione col metodo di Gram Resiste parzialmente agli acidi (metodo Ziehl-Gabbet), cioè alcune forme restano colorate *in toto* in rosso, altre presentano solo dei grossi granuli rossi, altre forme, e numerose, si decolorano assumendo la tinta bleu sbiadita. Le forme filamentose appaiono co-

lorate in rosso, a tratti, a rosario. Il bacillo assume anche i comuni colori di anilina.

Caratteri culturali - *Brodo*. — Dopo 24 ore a 37° intorbida il brodo, in seguito però si forma un sedimento bianco-opaco e alla superficie una pellicola sottile, appena visibile, che dopo 3-4 giorni si fa alquanto più spessa, e il liquido resta limpido, ma qualche fiocco, a mo' di nubecola, resta sospeso.

Gelatina. — Sviluppa in gelatina non molto rapidamente; *per infissione* dà una coltura appena visibile con fittone uniforme, costituito da coloniette puntiformi bianche aggruppate, le quali si fanno sempre più scarse e rade verso la profondità; superficialmente invece la cultura s'innalza a cupola e si espande un poco con grossi mamelloni, assumendo un pigmento roseo; *per strisciamento* si ha una cultura spessa, lucida, lievemente pieghettata, con margini sinuosi, la patina culturale dapprima rosea, assume invecchiando il colore rosso-corallo.

Agar glicerinato. — E' questo il terreno di cultura più favorevole. Sin da 24 ore dopo la semina si ha una spessa patina culturale, lucida, liscia, uniforme, che ricorda le patine culturali delle sarcine, cioè non ha caratteri speciali; il pigmento coll'invecchiare della cultura passa per diverse tonalità di rosso, fino a fermarsi al rosso-corallo.

Su piastre, colonie rotondeggianti, rilevate, spesse, pigmentate, al centro con qualche striatura raggiata e margini lisci.

Patate. — Su patate cresce anche bene formando una patina uniforme rosso-corallo, che invecchiando si fa asciutta.

Latte. — Non lo coagula e vi cresce bene. E' degno di menzione che i preparati del bacillo, fatti da una cultura in latte, resistono meglio agli acidi.

Potere patogeno. — Il bacillo è patogeno per conigli e cavie, ma solo inoculato nell'addome di queste dà lesioni caratteristiche consistenti in piccoli noduli grigi, grossi al massimo quanto un grano di miglio, sparsi qua e là sui visceri e qualcuno nella milza, contenenti pus in scarsa quantità, denso, cremoso, ricco di bacilli; si osservano inoltre le note anatomo-patologiche di una peritonite cotennosa.

Inoculato insieme con burro sterile, accresce il suo potere patogeno.

Acidoresistente II.

E' stato trovato dal dott. Cao nel contenuto intestinale delle larve di maggiolino (*Melolonta vulgaris*).

Forma. — Bacilli lunghi 5-6 volte la loro larghezza, molto più

grandi dei bacilli di Koch, con estremità arrotondite, eguali, e zona translucida attorno al corpo; osservansi con maggiore frequenza le forme filamentose ramificate.

Il protoplasma cellulare è anche in questo grossolanamente granuloso. La forma del bacillo raramente è diritta, più spesso è incurvata. Le brevi ramificazioni si staccano dal tronco quasi ad angolo retto.

Disposizione. — Spesso isolato, talora riunito a due per le estremità, più spesso aggruppato irregolarmente

Caratteri biologici. — Comuni al precedente, produce un bel pigmento rosso-arancione.

Comportamento con i colori. — Resiste alla decolorazione col Gram. Col Ziehl-Gabbet si colora parzialmente in rosso, e nelle forme filamentose, solo a tratti. Invecchiando le culture, e prolungando nei preparati un poco l'azione dell'acido, si vedono molte forme scolorite o colorate in bleu sbiadito. Si colora con i comuni colori d'anilina.

Caratteri culturali - Brodo. — Si ha intorbidamento del brodo di cultura e man mano che la cultura si sviluppa, si forma in fondo al tubo un sedimento bianco-rosso, ma il liquido resta sempre torbido.

Gelatina. — Non la fluidifica. Per infissione si ha un fittone bianco granuloso poco sviluppato, superficialmente molto più espanso, a capocchia mamellonata bianco-rossastra. Per strisciamento si ha una patina culturale, spessa, umida, leggermente increspata, la quale invecchiando si pieghetta più sensibilmente, di color rosso-arancio.

Agar glicerinato. — Su piastre: colonie rotondeggianti, spesse, lucide, a margini netti, superficie leggermente striata e come ondulata, pigmentata in rosso-arancione. A becco di clarino: patina culturale molto analoga a quella dell'acidoresistente I, meno che nel tono del pigmento, il quale tende verso l'arancione.

Patata. — Sviluppa bene, con patina spessa, umida, lucida, che invecchiando s'increspa un poco, pigmentata in rosso arancio.

Latte. — Non lo coagula, colora il liquido leggermente in roseo.

Potere patogeno. — Ha scarso potere patogeno, e in vena, uccide gli animali di prova solo se inoculato in forti quantità. Inoculato con burro accresce il suo potere patogeno e dà le note caratteristiche anatomo-patologiche dei pseudotubercolari.

Acidoresistente III.

E' stato isolato dal dott. Cao in un campione di terreno, inquinato da feci di larve di lamellibranchiati.

Forma e disposizione. — Ordinariamente forme cocco-bacillari con

protoplasma grossolanamente granuloso, e forme bacillari più lunghe, incurvate, qualcuna con una delle estremità a clava, più raramente forme ancora più lunghe filamentose, irregolarmente incurvate; non vedonsi ramificazioni. Il bacillo è circondato da un alone trasparente. Esso non presenta alcuna speciale disposizione.

Caratteri biologici. Immobile, aerobio, a differenza dei precedenti, *liquefà* lentamente la gelatina, non coagula il latte, non produce indolo, non sporifica, sviluppa lentamente a temperatura di stanza, meglio a 37°, produce in cultura un pigmento rosso-arancio-pallido, quasi rosa.

Comportamento con i colori. — Prende il Gram, resiste parzialmente alla decolorazione con gli acidi, però coltivato nei grassi, resiste in toto. Si colora con i comuni colori di anilina.

Caratteri culturali - Brodo. — Sottile pellicola nuotante alla superficie sul liquido limpido; essa in seguito si stacca a pezzi per depositarsi in fondo.

Gelatina. — Infissione: cultura a chiodo granulosa, poco sviluppata, che si approfonda sempre più, man mano che lo strato superficiale di gelatina si va liquefacendo. Per strisciamento si ha dopo 36-48 ore una patina uniforme, rosea, lucida, spessa, increspata con margini orlati, sinuosi, la quale in seguito si raggrinza tutta, fondendo la gelatina, e raccogliendosi come una poltiglia nel fondo del tubo.

Agar glicerinato. — Colonie su piastre piuttosto grandi, rotondeggianti, spesse al centro, con margini piccoli sottili, merlettati e seghettati; la colonia è asciutta giallo-arancio quasi roseo, e appare non liscia ma leggermente increspata e striata: si stacca con facilità ed emulsionata in acqua per allestire un preparato, dà sul vetro l'unto, come se si trattasse di un corpo grasso. A becco di clarino, la patina nella parte centrale è spessa, uniforme, asciutta, lucida, con qualche increspatura e finamente striata; circondata da un alone largo, più sottile, trasparente, con margini finamente merlettati e seghettati; il colore della cultura è rosso-rosa, verso i margini la tinta è più attenuata, ma invecchiando il tono del colore si rinforza, diventando quasi rosso-cupo.

Patata. — Sviluppa bene con patina granulosa, mamellonata rossastra.

Latte. — Non lo coagula e dà al liquido una tinta giallo-rossastra.

Potere patogeno. Scarso, ma si accresce se il bacillo è inoculato con burro sterile.

Acidoresistente IV.

E' stato trovato e isolato da me in un modo interessante.

Preso il pus di una cavia, morta per inoculazione di un campione di burro sterilizzato, in cui 15 mesi prima avevo seminato la *Streptothrix viridis*; lo inoculai sottocute in un coniglio, previo esame bacterioscopico che mi aveva in esso mostrato una *streptothrix* bacilliforme, che contrassegnai *exviridis* e che appresso descrivo.

Ebbi la morte dell'animale (coniglio) in 12ª giornata, con reperto microscopico assolutamente negativo, meno che un ingrossamento sensibile alle ghiandole mesenteriche, da le quali isolai l'*exviridis* di cui sopra (e che col metodo delle diluizioni, avevo isolato direttamente dal pus della cavia) e dalla stessa piastra, insieme ad altre colonie di coli, sottile, ecc., l'*acidoresistente IV*.

Forma e disposizione. — Bacilli di lunghezza molto variabile, con estremità eguali, leggermente arrotondite, riuniti spesso a due; talora a lunghi filamenti ondulati e tortuosi, costituiti da tanti piccoli segmenti corti, circondati da una zona translucida. Raramente si incontrano forme isolate più o meno lunghe a protoplasma uniforme, con estremità eguali arrotondate, leggermente incurvate e con alone trasparente. Non si notano forme ramificate.

Caratteri biologici. — Le forme bacillari sono mobili, le forme filamentose non hanno movimenti molto evidenti; l'ossigeno è necessario al loro sviluppo che si compie bene a 37°, e anche a temperatura di stanza; non produce indolo, non fu osservata sporificazione, in cultura produce un bel pigmento rosso.

Comportamento con i colori. — Si colora bene a freddo con la fuchsina carbolica e gli altri colori di anilina, resiste bene alla decolorazione con il Gram, è resistente agli acidi, però l'acidoresistenza si manifesta per le forme bacillari e solo parzialmente per le altre forme.

Caratteri culturali. — *Gelatina*: Non la fonde. Per infissione, presenta lungo il canale d'innesto una stria finissimamente merlettata e granulosa, e in superficie nel punto di penetrazione dell'ago, una piccola patina rilevata convessa a margini rotondeggianti irregolari e superficie mamellonata, striata, pigmentata in rosso-carneo.

Per strisciamento si ha una patina rilevata, spessa, finamente striata in senso longitudinale e ancora più finamente in senso trasversale, con margini finamente merlettati, sottili, trasparenti, e superficie lucente come cera, e di colorito rosso-carneo, che invecchiando diventa rosacarico.

Agar glicerinato. — Su piastra colonie piccole, rotondeggianti, orlate ai margini con una zona chiara e centro spesso, pigmentatò in rosa prima e in rosso-lacca in seguito, e striato in senso raggiato e a cerchi concentrici, le colonie profonde sono puntiformi, lenticolari, poco sviluppate, bianco-sporche, senza nulla di caratteristico.

In tubi, patina molto simile a quella che si ha per strisciamento in gelatina; le striature superficiali formano un elegantissimo disegno e la cultura, che prima è rosso-carne, finisce, invecchiando, coll'assumere un colorito rosso-lacca.

Staccata con l'ago un po' di patina ed emulsionata in acqua per allestire un preparato, si ha sul vetrino l'unto, come se si trattasse di un corpo grasso.

Patata. — Annerisce la patata e assume l'aspetto di tante goccioline di ceralacca rossa, che ammassandosi formano una patina uniforme mamellonata, con margini sinuosi e merlettati.

Latte. — Ncn coagula e si forma una pellicola rosso-arancio.

Brodo. — Già dopo 24 ore il liquido s'intorbida e si forma man mano un sedimento rossastro, non si forma pellicola e il liquido resta torbido.

Potere patogeno. — Scarso. Inoculato con burro in addome accresce la sua virulenza e uccide l'animale di prova in 5-10 giorni, con reperto di peritonite adesiva con formazione di noduli contenenti pus denso, cremoso, ricchi di bacilli.

Acidoresistente V.

E' stato trovato e isolato da me dal burro del mercato di Messina. E' il più bello fra tutti e il più interessante perchè si avvicina di più al bacillo di Koch.

Forma. — E' un bacillo piccolo, sottile, tàlora moniliforme, o a coccobacterio, o a bastoncelli rigidi, tal'altra allungato a filamenti mai molto lunghi, raramente ramificati. Le forme piccole hanno una delle estremità più grossa, come un vero pseudodifterico, le altre forme sono lineari con estremità appuntite, le rarissime forme filamentose, che si riscontrano nelle culture in brodo, sono incurvate, talora ramificate con brevi ramificazioni che si staccano ad angolo retto.

Disposizione. — I bacilli si dispongono parallelamente a gruppi senza ordine definito, raramente si vedono uniti a due per le loro estremità.

Caratteri biologici. — Il bacillo è immobile, aerobio obbligatorio,

non liquefà la gelatina, non coagula il latte, non produce indolo, sviluppa bene da 20° a 40°, ma a temperatura di stanza, molto lentamente; mentre a 37° già dopo 24 ore si vede lo sviluppo della patina culturale, non sporifica, *non produce pigmento.*

Comportamento con i colori. — Resiste al Gram, resiste *in toto* agli acidi; si colora con i comuni colori di anilina, specie se la cultura è vecchia.

Caratteri culturali. — *Brodo.* Dopo 24 ore formazione di pellicola bianco-giallina, che successivamente cresce di spessore, si attacca fortemente alle pareti del tubo, s'increspa rigogliosamente, e si ripiega, il liquido resta limpido e solo si ha qualche fiocco sospeso dovuto a un pezzetto di membrana pellicolare staccatosi, non si ha alcun sedimento.

Gelatina. — Per infissione, un fittone pochissimo rigoglioso, lineare, sottile, granuloso, a chiodo, con formazione superficiale, nel punto di penetrazione dell'ago, di una patina culturale rilevata, mamellonata, espandentesi alla superficie, di color bianco sporco. Per strisciamento, una bella patina tutta increspata a margini fini, orlati, sinuosi e merlettati, di color bianco-opaco.

Agar glicerinato. — Su piastre coloniette rotondeggianti, sottili, trasparenti, bianco-opache, asciutte; con una piccola piega centrale rilevata, spessa, bianco-giallina, margini irregolari, sinuosi, frastagliati, superficie spesso sottilmente pieghettata in senso raggiato e trasversale.

Alla lente si ha la superficie finamente granulosa. Toccata con l'ago la colonia si spezzetta e si stacca con facilità, emulsionata in acqua su vetro per allestire un preparato, si forma come una panna untuosa sul vetrino, come se si sciogliesse un corpo grasso. Per strisciamento, culture rigogliose bianche-opache, spesse, lucide, con superficie scabra, mamellonata, con margini sinuosi, irregolari, talora la superficie presenta increspature e rilievi, e invecchiando la cultura si essicca, si assottiglia, diventa più asciutta, si raggrinza formando quasi dei solchi e delle spaccature irregolari.

Patate. — Si formano colonie biancastre asciutte poco sviluppate.

Latte. — Non coagula, si forma una leggera pellicola biancastra.

Potere patogeno. — E' patogeno per cavie e conigli con formazione di ascessolini, con pus denso, giallastro, nelle ghiandole linfatiche e negli organi interni.

Acidoresistente VI.

Fu trovato dal prof. Sanfelice nello smegma di cane e da me isolato. Nei preparati fatti direttamente dallo smegma si vedono numerosissimi bacilli sottili, corti, variamente disposti a massa, resistenti agli acidi *in toto*. Tali preparati io ho sottoposti, prima della colorazione, al trattamento con xilolo, cloroformio ed alcool, secondo una tecnica da me seguìta, allo scopo di ottenere un disgrassamento completo.

Isolati i bacilli dall'animale di prova, in cui era stato inoculato sottocute lo smegma molto diluito, con reperto di un ascesso in sito, si presentano così:

Forma e disposizione. — Bacilli piuttosto corti, piccoli, con estremità uguali arrotondate, isolati o riuniti a 2 o anche a catena di 3, 4 elementi; talora forme più allungate, diritte o leggermente incurvate, con estremità appuntite; non si vedono forme ramificate.

Caratteri biologici. — Immobile, aerobio, non liquefà la gelatina, non coagula il latte, non produce indolo, non sporifica, sviluppa bene a temp. di stanza, meglio a 37°, produce in cultura un pigmento rosa.

Comportamento con i colori. — Resiste alla decolorazione col metodo Gram; agli acidi (metodo Ziehl-Gabbet) si colora parzialmente e vedonsi grossi granuli rossi, accanto a forme bacillari scolorite. Facendo preparati dal bacillo coltivato in un terreno grasso, si ha la resistenza agli acidi *in toto*. Il bacillo si colora a freddo con i colori comuni di anilina, sopratutto se la cultura è vecchia.

Caratteri culturali. — *Brodo*: intorbida dopo 24 ore e si forma una sottile pellicola che aderisce al vetro del tubo, mentre al fondo si forma uno scarso sedimento biancastro, mentre il liquido resta torbido.

Gelatina. — Per infissione si ha sviluppo di una cultura a chiodo lungo il canale d'infissione, non molto rigogliosa, biancastra, granulosa, costituita da coloniette puntiformi, aggruppate insieme; alla superficie lo sviluppo è più abbondante e si forma una colonia rosa-cupo, rilevata a mammelloni.

Per strisciamento, una patina uniforme sottile, trasparente con orli più spessi, sinuosi, pigmentata in rosa-pallido che invecchiando diventa rosa-scuro.

Agar glicerinato. — Piastre: coloniette piccole, rotonde superficiali, sottili, trasparenti, con orli più spessi che crescendo la colonia formano come zone concentriche, di color rosa-scuro; la colonia si stacca con

facilità. A becco di clarino: patina uniforme lucida, sottile, trasparente, umida, più spessa ai margini che sembrano orlati, leggermente sinuosi, di color rosa-pallido, che invecchiando diventa rosa-scuro.

Patate. — Sviluppa un po' stentatamente con formazione di una patina uniforme sottile, liscia, quasi rossastra, che annerisce la patata.

Latte. — Non lo coagula e sviluppa in superficie con formazione di una pellicola sottilissima, bianco-rossastra

Potere patogeno. — Inoculato in grande quantità uccide l'animale di prova senza dare lesioni apparenti: coltivato in burro o inoculato insieme con questo grasso, determina le caratteristiche lesioni macroscopiche della pseudo-tubercolosi, con formazione di noduli e ascessi circoscritti ricchi di bacilli, i quali si colorano *in toto.*

Acidoresistente VII.

Isolato da me dallo smegma di cane. Il cane era lo stesso, ma questi due acidoresistenti non furono trovati nello stesso tempo.

Forma e disposizione. — Bacillo piccolissimo sottile, con una delle estremità un poco più grande, molto più piccolo del precedente, diritto o leggermente incurvato, con qualche forma coccobacillare.

Come pel precedente non si notano forme filamentose o ramificate. I bacilli sono disposti a gruppi e talvolta pare abbiano la disposizione a catene.

Caratteri biologici. — Analoghi al precedente, produce però un pigmento giallastro.

Comportamento con i colori. — Resiste agli acidi in toto, ma non tutte le forme bacillari sono resistenti, alcune si decolorano con gli acidi e con l'alcool, senza assumere bene il color bleu. Come il precedente, coltivato in terreno grasso (burro) resiste in toto. Prende il Gram. Si colora con i comuni colori.

Caratteri culturali. Brodo. — Forma dopo 24 ore una pellicola sottile, che man mano cresce, si stacca e va al fondo, lasciando il liquido limpido.

Gelatina. — Non la fluidifica, ma si sviluppa stentatamente, per infissione, da cultura a chiodo poco rigogliosa, granulosa; per strisciamento, patina giallastra, opaca, spessa, increspata, asciutta, con margini sinuosi, sottili, trasparenti, e finamente merlettati.

Agar, su piastre, coloniette piccole, rotondeggianti, asciutte, giallo-arancio pallido, con centro opaco e margini fini, sinuosi; la colonia si stacca a pezzi ed emulsionata in acqua come si usa per allestire un

preparato, si ha sul vetro la formazione di una panna untuosa, come se si sciogliesse un corpo grasso.

A becco di clarino, patina giallastra, che invecchiando diventa giallo-arancio, increspata leggermente e striata, con margini sottili merlettati e trasparenti.

Patata. — Sviluppa coloniette rotonde piccole che si fondono insieme dando una patina mamellonata, asciutta di color giallo-roseo.

Latte. — Non coagula e il bacillo si sviluppa bene con formazione di una pellicola bianco-giallastra.

Potere patogeno. — Non è patogeno, ma inoculato con burro lo diventa.

Osservazioni. — Il VI e il VII acidoresistente furono, come dissi, isolati da lo smegma: non so pertanto, se qualcuno dei due sia identico al bacillo di Alvarez e Tavel, di cui non ho potuto avere la cultura per fare i necessari confronti.

Per quanto rilevasi dalle descrizioni che si leggono nei manuali, non si può identificare nessuno dei miei bacilli, coll'ormai celebre bacillo dello smegma.

Ad ogni modo è degno di nota il fatto, che dallo stesso materiale è stato possibile isolare due bacilli differenti per i caratteri morfologici, culturali, e patogenetici. Essi hanno caratteri comuni con tutti gli acidoresistenti e quindi anche fra loro, ma sono assolutamente due bacilli distinti. Degno anche di rilievo è il fatto che questi bacilli esaminati direttamente dallo smegma o da una cultura su terreno grasso, sono resistenti agli acidi in toto, mentre che in cultura su agar glicerinato lo sono parzialmente.

* * *

Caratteri comuni di questi sette bacilli acidoresistenti. — Qnanto alla forma si dovrebbero dividere in 2 gruppi: il 1° gruppo costituito da bacilli che presentano un evidente pleomorfismo, con presenza di forme filamentose, e a questo gruppo appartengono gli acidoresistenti I, II, III, IV e VI. Questo gruppo bisogna ancora suddividerlo in bacilli che presentano evidenti forme ramificate (I e II) e in quelli in cui non se ne vedono (III, IV, VI). Il 2° gruppo (V e VII) presenta in prevalenza i caratteri morfologici dei pseudodifterici.

I caratteri biologici sono quasi uguali per tutti e sette, meno il IV che presenta bacilli leggermente mobili e il III che liquefà lentamente la gelatina.

Quanto alla mobilità dei bacilli acidoresistenti, già Courmont e Descos (34), coltivando questi bacilli in culture omogenee col metodo di Arloing per il bacillo della tubercolosi (agitazione frequente delle culture) avevano notato che i bacilli acidoresistenti sono mobili, ma in diverso grado: il più mobile è parso loro il bacillo di Coggi, il meno mobile il Timoteo bacillo.

Quanto alla formazione dell'enzima proteolitico, pare sia una proprietà eccezionale dell'acidoresistente III.

Fra i caratteri biologici ho compreso la formazione del pigmento in cultura: e tutti ne formano, meno il V. La varietà del colore ha una importanza secondaria, perchè dipende anche dalla composizione del terreno; ricorda, peraltro, quanto avviene per le *streptothrix*. Sarebbe molto semplice distinguere gli acidoresistenti dal colore che assumono nelle culture, ma sarebbe erroneo, perchè le tinte di parecchi fra essi, con l'invecchiare delle culture, rinforzano il loro tono e quasi si confondono. Così il I e il II; il III e il IV; rimanendo nettamente distinti il V e in certo modo il VI e il VII.

Un altro fatto degno di rilievo è la formazione di una sostanza grassa, rilevabile con l'emulsione in acqua su vetrino, da parte degli acidoresistenti III, IV, V e VII.

Il comportamento con i colori è anch'esso press'a poco uguale in tutti, meno che per il V, il quale resiste agli acidi bene e si colora in toto. Per gli altri è notevole che coltivati su terreni grassi, acquistano anch'essi la resistenza agli acidi in toto, mentre prima la possedevano solo parzialmente.

I caratteri culturali differiscono sostanzialmente fra loro in peculiarità degne però di rilievo, quello che peraltro si stacca completamente da tutti gli altri, è l'acidoresistente V, il quale è quello che per i suoi caratteri culturali si avvicina di più al bacillo della tubercolosi di Koch.

Quanto al potere patogeno è in tutti piuttosto scarso ma esso si accresce se si pratica l'inoculazione con burro sterile o altro grasso.

Questi sette acidoresistenti non sono assolutamente da confondersi con nessuno degli acidoresistenti conosciuti coi quali li confrontai; acidoresistenti provenienti dal laboratorio di Kràl e che sono: il bacillo della Rabinowitsch, i cinque bacilli della Tobler, i due gras-bacilli di Moeller.

***

Sarebbe stato mio desiderio fare una revisione di tutti gli acidoresistenti conosciuti, ma non tutti i resistenti agli acidi, finora descritti, furono isolati e coltivati, nè tutti quelli isolati forman specie distinte, anzi,

come avvertii già, le forme tipiche son poche, e non superano di molto, quelle che abbiamo in laboratorio, e che attentamente esaminai.

Bacillo di Lidia Rabinowitsch.

E' meritamente il più celebre degli acidoresistenti. Moeller ha identificato questo bacillo a quello di Petri, tanto che in scienza esso piglia il nome di Petri-Rabinowitsch. Potet ad esso identifica il bacillo I di Korn. Coggi, il suo bacillo isolato dal burro di Milano. Binot descrive il suo bacillo isolato dal burro di Parigi, in maniera da riconoscere in esso il bacillo dello Rabinowitsch. Così pure Karlinski e molti altri che dei loro bacilli han soltanto dato delle descrizioni.

Certamente quindi il bacillo di Petri-Rabinowitsh è una forma di bacillo acidoresistente tipico, a cui si avvicinano molti altri bacilli descritti come specie a sè.

Questo bacillo io lo studiai l'anno scorso (35) e non ho nulla da modificare alle conclusioni cui giunsi, che cioè esso, per i suoi caratteri morfologici culturali e patogenetici. sia una vera *streptothrix*.

Anzi l'ispirazione e l'orientamento de le presenti ricerche, mossero da questa constatazione, essendo legittimo il dubbio, che anche gli altri bacilli della *pseudotubercolosi* o *acidoresistenti* fossero delle *streptothrix* vere e proprie. Morfologicamente essi presentano, quasi tutti, forme filamentose, ramificate, spesso terminate a clava; ma per i caratteri culturali (sopratutto i bacilli della Tobler) si allontanano dal tipo delle culture di *streptothrix* e da lo stesso bacillo della Rabinowitsch.

***

Con un artificio di tecnica cercai di indurre modificazioni tali da approssimare al tipo delle streptotricee l'aspetto esteriore delle culture di questi bacilli.

Praticai a tal uopo passaggi alternati da terreno grasso in agar glicerinato — con esito negativo — e non poteva essere diversamente, giacchè come io stesso ebbi già a constatare, le *streptothrix* in terreno grasso si spezzettano, senza perdere per lunghissimo tempo la loro vitalità.

In campioni di burro sterile, in cui da 15 mesi avevo seminato la *Streptothrix Eppinger* e la *viridis*, ho trovato due acidoresistenti, che ho contrassegnato *ex-viridis* ed *ex-Eppinger*, e di cui dovrò occuparmi più estesamente in seguito. Il grasso quindi non è il mezzo più adatto a restituire alle culture di acidoresistenti i caratteri dalle *streptothrix*, anzi, con tal mezzo, è più probabile l'inverso.

Alternai allora seminagioni in agar, in patate, in brodo, con qualche passaggio attraverso un animale.

I risultati furono soddisfacenti.

Il Timoteo-bacillo e il Gras-bacillo II, nonchè il Tobler V e il III e in certo qual modo il II e il IV assunsero l'aspetto di culture di streptotricee, sopratutto su patate, anzi i due bacilli di Moeller, assunsero l'aspetto di vere e proprie *streptothrix*. Il I Tobler non mi è stato possibile modificarlo e la descrizione di esso resta quale la diede l'autrice.

Tobler I.

« Bacilli di lunghezza molto variabile, spesso abbastanza più lunghi che larghi, diritti o leggermente piegati, spesso con le estremità clavate. Nelle vecchie culture di tanto in tanto sono cresciuti filamenti con rade ramificazioni. Però risultano sempre le forme corte e non ramificate e specialmente in preparati colorati di organi infetti vi sono forme granulari ».

Quantunque le colture in agar e e su patate non assumano i caratteri delle culture di streptotricee, pure da l'insieme della descrizione che ne fa la Tobler, e dall'esame diretto delle patine culturali e del bacillo che è pleomorfico, con forme ramificate e alcune clavate, si vede che questo bacillo ha molti caratteri di affinità col genere *streptothrix*, o per lo meno, a nessun altro bacillo lo si potrebbe avvicinare che non sia appartenente al genere *streptothrix*.

Tobler II.

Forma a bastoncelli di lunghezza e larghezza molto variabile e già in culture fresche si trovano forme cresciute in fili con vere e ricche ramificazioni ed estremità clavate. In agar dà patina leggermente giallo-rossastra, pieghettata, e le singole colonie sono rilevate rotonde con orlo piatto e centro rilevato. In brodo una pellicola rosso-rosa spessa, pieghettata, che si stacca a pezzi e va al fondo lasciando il liquido chiaro — dà forte odore di trimetilamina. Su patata dà una patina giallo-arancio sollevata, secca, pieghettata che ricorda la patina della *streptothrix* gialla.

Tobler IV.

E' molto simile al precedente. Solo è degno di nota il fatto che nelle semine numerose che ho fatto, alternandole su diversi terreni culturali, mi parve a certo punto di vedere la cultura del Tobler IV inquinata, e allora procedendo allo esame della patina inquinante, vidi che si trattava di un altro acidoresistente.

Con i metodi consueti procedetti al suo isolamento e ho ottenuto un

altro acidoresistente che assomiglia per la forma ad un pseudodifterico e che ho contradistinto:

Tobler IV-*B*.

Forma e disposizione. — E' un bacillo piccolo sottile alquanto curvo, con una delle estremità più grossa; talora ha la forma di cocco, talaltra quella di bastoncello rigido, ma le forme a pera sono più numerose. Non ha disposizione caratteristica.

Caratteri biologici. — E' immobile, aerobio, sviluppa a temperatura di stanza e ottimamente a 37°, non liquefà la gelatina, non coagula il latte, non produce indolo, non ha pigmento, ma annerisce il terreno nutritivo su cui vegeta (agar, patate); e emulsionato in acqua per allestire un preparato, dà l'unto al vetro come se fosse un corpo grasso.

Comportamento con i colori. — Prende il Gram, resiste agli acidi *in toto*, a differenza del Tobler IV *A*, che si colora col metodo Ziehl-Gabbet solo parzialmente. Prende i colori di anilina.

Caratteri culturali. — Per infissione in *gelatina* si ha una cultura a chiodo poco rigogliosa, per nulla caratteristica; per strisciamento si ha una patina sottile, asciutta, striata, a margini seghettati, di color biancosporco. In *agar*, colonie rotonde, su piastre, poco rilevate, sottili, trasparenti, con nucleo centrale più spesso, biancastro, a margini merlettati; la colonia si stacca a pezzi. A becco di clarino, si ha una patina biancastra, asciutta, sottile, quasi trasparente, striata longitudinalmente e in modo più ricco ed elegante, trasversalmente; con margini fini, sinuosi, seghettati; l'agar si colorisce in bruno molto intenso, man mano che la cultura invecchia.

Patata. — Patina poco sviluppata, quasi simile a quella su agar, con pieghettature e increspature più rilevate; anche la patata si colora in bruno.

Brodo. — Intorbida il brodo, ma già dopo 24 ore si forma una pellicola increspata che aderisce al vetro, e un sedimento biancastro, mentre il liquido resta limpido.

Latte. — Non coagula, si inbrunisce un poco.

Potere patogeno. — Scarso. Bisogna inocularlo in forte quantità perchè uccida l'animale di prova.

Osservazione. — Questo sdoppiamento del Tobler IV, assolutamente accidentale, mi è parso degno di particolare menzione, dovendosi escludere un inquinamento dell'ambiente esterno per varie ragioni: 1° perchè l'aspetto della cultura inquinata non era analogo agli ordinari inquinamenti delle culture, e sembrava anzi, più che un inquinamento, una fusione di due patine culturali; 2° perchè nella ricerca che io feci degli acidoresistenti, non ne potei isolare nessuno dall'aria del laboratorio; 3° perchè gli abbondanti germi banali dell'aria avrebbero avuto il sopravvento, ove l'inquinamento fosse stato determinato da deficienze nelle manualità tecniche; 4° perchè infine il germe inquinante, isolato e coltivato, ha caratteri morfologici, biologici e culturali

molto affini a quelli degli acidoresistenti in genere, al cui gruppo devesi ascrivere.

Pertanto esso non si può considerare come un ordinario inquinamento, ma piuttosto come una forma derivata dal preesistente Tobler IV, una specie di filiazione, con genesi analoga a quella delle varietà rispetto alla specie.

Quanto in ciò abbiano influito i passaggi alternati che io facevo, non saprei precisare.

Tentai riottenere da la forma derivata, la forma primitiva, per dare la dimostrazione inversa e decisiva, ma non ci sono riuscito — e non poteva essere diversamente, perchè la varietà non riproduce mai più il tipo da cui proviene.

Tobler III.

Forma a bastoncelli di lunghezza variabile, in generale dominano le forme corte, raramente clavate, lunghi fili con ramificazioni scarse.

Nei passaggi alternati son riuscito a fare acquistare a questo bacillo un aspetto culturale su patata, che ricorda quello delle streptothricee, cioè formazione di una patina culturale asciutta, color rosso-carminio, spessa, mamellonata, pieghettata, con colonie isolate, rilevate a capocchia di spilli. Anche l'aspetto microscopico si è modificato alquanto, predominando le forme filamentose ramificate.

Tobler V.

Ha molta somiglianza col precedente sia sull'aspetto microscopico che culturale, e le patine culturali, su patate e su agar, sopratutto invecchiando, s'increspano, si pieghettano, s'accartocciano come le colture di streptothricee.

***

Esaminando in conclusione dal mio punto di vista i cinque acidoresistenti della Tobler, si vede che il più lontano dal tipo delle *streptothrix* è relativamente l'acidoresistente I, il più prossimo il III e il V; tutti però, se non possono considerarsi come vere e proprie streptothrix, a simiglianza del bacillo della Rabinowitsch, sono grandemente affini al tipo, sia per il pleomorfismo, e le ramificazioni che presentano, come pure per l'aspetto culturale, che sopratutto invecchiando e su patata, assumono.

Del resto volendo procedere per eliminazione, a nessun altro gruppo di germi questi bacilli della Tobler, possono avvicinarsi, se non alle

streptotricee. La Tobler stessa, del resto, avvicina il suo bacillo II a quello della Rabinowitsch, che abbiamo visto essere una *streptothrix*. Ma in parentesi nelle culture del nostro Istituto, non ci son parse molto evidenti tali analogie e simiglianze, stabilite da l'autrice meno che per la forma.

Qualcuno dei cinque acidoresistenti della Tobler, morfologicamente ricorda il bacillo della difterite, anzi il Tobler IV *B* è addirittura un pseudodifterico: ma a parte che il posto che si dà ai bacilli della difterite, nella sistematica, è prossimo alle streptothricee (Lehmann e Neumann) gli acidoresistenti per molti caratteri differiscono dal bacillo della difterite, principalmente per il comportamento agli acidi e l'azione patogena.

Quanto ai due bacilli del Moeller, da me attentamente studiati, il Timoteobacillo o grasbacillo I, e il grasbacillo II, non esito a considerarli come *streptothrix* vere e proprie. Ed infatti eccone la descrizione:

Timoteobacillo.

E' stato isolato dall'erba dei prati (fieno *Timotheus arvensis*) « nei detriti di piante macerate, lunghi bacilli da 1 a 4 μ, larghi 0.2 a 0.5 μ, spesso curvi, talvolta costituiti da filamenti segmentati, di ammassi di angoli tronchi; essi contengono qualche volta dei grani, che han ritenuto la materia colorante più fortemente che il resto del protoplasma; a una estremità dei filamenti si possono vedere delle dilatazioni ampolliformi. Tali bacilli sono corti e grossi in culture su siero, slanciati nel latte, assai lunghi in gelatina ».

Da questi caratteri dati dall'A. si vede anzitutto il pleomorfismo del suo bacillo con prevalenza di forme filamentose clavate. E quantunque l'A. non parli di forme ramificate, pure io le ho costantemente viste, e prima di me Mayer (36) e Lehmann e Neumann (37), i quali ultimi dànno addirittura al bacillo di Moeller, gli stessi caratteri microscopici del bacillo di Petri.

« Culture: Si sviluppa bene a temperatura di stufa, a capo di 36 ore appaiono di già le colonie. La vegetazione si fa male a temperatura di stanza (nei climi nostri ciò non è). Il bacillo cresce su tutti i mezzi usuali. Su agar, cultura scarsa, dapprima bianca poi grigia, poi giallastra, poco elevata, secca, s'inspessisce con poca tendenza ad estendersi; rassomiglia molto a una cultura di bacilli di Koch ».

Veramente la cultura che abbiamo nel laboratorio, non ha questi eccessivi caratteri di somiglianza con la cultura del bacillo di Koch, come afferma categoricamente l'A., anche perchè, oltre alla maggiore

rapidità di sviluppo, ha un colore giallo oro, sviluppa bene a temperatura di stanza, forma su agar una patina secca, pieghettata, abbondantissima. Sono invece più spontanei e naturali i confronti col bacillo Petri-Rabinowitsch.

« Su *patata*, cultura spessa granulosa secca, giallastra, aderentissima al mezzo di cultura ».

Questi caratteri rispondono anche per le nostre culture, in cui per altro è più pronunziato, l'aspetto mamellonato delle streptotricee.

« *Gelatina :* non la liquefà e per strisciamento ha lo stesso aspetto che in agar e in siero. Nel *latte*, al 5° giorno piccole masse giallo-rossastre a livello dello strato cremoso formanti un anello giallastro ; non lo coagula »,

E' un bacillo patogeno, e produce, secondo lo stesso Moeller, le stesse lesioni del bacillo della Rabinowitsch.

Dai caratteri sommariamente sopra riportati si vede che il Timoteobacillo differisce dal bacillo di Koch e dagli acidoresistenti della Tobler, e solo ha caratteri di affinità col bacillo di Petri-Rabinowitsch.

Grasbacillo II.

Ha la forma variabile. Secondo l'A. « la maggior parte di questi elementi hanno da 1 a 5 μ di lunghezza, da 0.2 a 4 μ di larghezza. Le forme lunghe si incontrano principalmente nelle granulazioni delle cavie inoculate.

Esse formano spesso delle γ, degli angoli tronchi, accollandosi per le estremità ; esse sono frequentemente ramificate o costituiscono dei filamenti; talvolta esiste ad una delle estremità dei bacilli una dilatazione ampolliforme. Il distacco delle ramificazioni si fa ad angolo retto. D'un modo generale, nelle culture su mezzi solidi si osservano dapprima dei cocchi e dei bacilli, in 4ª-5ª giornata, se la cultura è mantenuta a 37° appaiono lunghi filamenti ramificati. Nelle culture in mezzi liquidi il bacillo non prende questo aspetto che assai tardivamente. Nel latte assume la forma di *coccothrix*.

Resiste agli acidi parzialmente, le culture si presentano :

« In agar-glicerinati ; rapido sviluppo, vegetazione esuberante ; piccole colonie dapprima grigiastre a l'aspetto di goccioline, tosto riunentisi le une a le altre e piglianti una tinta giallastra. Grumi nel liquido di condensazione che schiarisce dopo qualche tempo. Su patata a 37 gradi vegetazione lussureggiante, con patina spessa, grigiastra ».

Questa descrizione concorda con quel che osservai nella cultura del nostro laboratorio : ma bisogna rilevare, che le forme filamentose ramificate sono le più numerose e si colorano a tratti col metodo Ziehl-Gabbet ; nelle culture su agar si ha una patina ricca, esuberante, pieghettata, talvolta mamellonata, con colonie ombelicate, molto aderente al sustrato e

difficilmente spezzettabile. Su patata, la cultura è ancora più lussureggiante, con pieghettature molto accentuate e colonie rilevate.

Il Grasbacillo II di Moeller, per questi caratteri sembra a mio credere, come il bacillo della Rabinowitsch, una *streptothrix* vera e propria.

***

Da la superiore descrizione degli *acidoresistenti* più tipici ed importanti fra quelli conosciuti, risaltano i caratteri comuni che essi hanno fra loro, cioè:

Caratteri microscopici : 1. Evidente peomorfismo che va da le forme di cocco-bacillo a le forme clavate e filamentose. 2. Presenza di forme ramificate più o meno abbondanti, e con ramificazioni *vere*, più o meno lussureggianti ed intricate. 3. Nei tessuti prevalenza delle forme bacillari.

Comportamento con i colori. — Si colorano con i comuni colori, non si decolorano al Gram, resistono più o meno parzialmente agli acidi, coltivandoli nei grassi resistono *in toto.*

Caratteri biologici. — Sono quasi tutti immobili-aerobi-pigmentati, non sporificano, non producono enzima proteolitico nè coagulante, non producono indolo, sviluppano a temperatura di stanza.

Caratteri culturali. — Sono in generale culture cromogene ed hanno una certa mutevolezza nel tono del colore, dovuta molto probabilmente alla composizione del terreno nutritivo o anche ad altre cause che sfuggono alla nostra indagine. Queste caratteristiche cromogene fanno pensare a quelle analoghe delle streptotricee.

Le patine culturali su agar glicerinato, non hanno un aspetto uniforme, regolare, liscio, ma la superficie a seconda che la forma è più o meno prossima al prototipo, va dalla fine striatura, all'increspo e alla pieghettatura; e i margini, da la sottile seghettatura, alla formazione di un elegante merletto frastagliato e trasparente. Questi fatti si notano sopratutto nelle culture vecchie.

Su patate si hanno approssimativamente gli stessi fatti.

Caratteri patogenetici. — Tutti gli acidoresistenti hanno in generale una patogenicità scarsa, anzi alcuni non sono affatto patogeni. Così nelle mie mani, praticando iniezioni su cavie e conigli, in vena, addome, sottocute e in trachea, non si son mostrati patogeni il Tobler I e i miei III e VI. Gli altri sono patogeni specialmente inoculati in addome e su le cavie. Tutti poi, compresi quelli non patogeni, inoculati

con burro sterile, lo diventano e uccidono l'animale di prova, in un numero di giorni che varia da 5 a 30.

In questa osservazione io non ho seguito che le orme di Holscher (38), Moeller (39), Lehmann e Neumann (40), i quali hanno inoculato i pseudo tubercolari insieme con burro, nella cavità peritoneale, nella dura madre, nei reni, nelle arterie, di cavie, conigli e vitelli, ottenendo lesioni caratteristiche, con formazione di false membrane e noduli tubercoliformi, con apprezzabile accrescimento della virulenza dei bacili, mentre che d'altro canto, iniettando semplicemente burro sterile, ciò non si aveva.

Habitat. — La provenienza di questi bacilli è ordinariamente il latte e il burro, o le secrezioni grasse dell'organismo (smegma, cerume, sevo, secreto nasale, feci) ma essi si trovano anche in natura (erba, terreno, ecc.).

Nessuna relazione c'è fra l'*habitat* di questi bacilli e il fenomeno della resistenza agli acidi, come ebbi già a dimostrare per le streptotricee, dovendo assolutamente escludere, che l'acidoresistenza si debba a grasso aderente meccanimente al corpo bacterico, o penetrato come tale nel corpo stesso.

Molti bacilli peraltro, specialmente nel genere *streptothrix* coltivati nei grassi diventano resistenti agli acidi, o possono acquisire tale proprietà, definitivamente alla specie.

***

Questi caratteri fondamentali comuni dànno fisonomia propria al gruppo degli acidoresistenti, per cui merita di essere un gruppo autonomo.

Ma vediamo ora, ciò che è più difficile e delicato, i rapporti che questi bacilli hanno con gli altri.

Il solo che ha affrontato determinatamente la questione è il Potet (31). Prima di lui gli autori avvicinavano, senza conveniente indagine critica, alcuni acidoresistenti al bacillo della difterite, altri, sopratutto per le lesioni sperimentali che cagionano, all'*actinomyces*.

Potet afferma che il gruppo dei bacilli acidoresistenti dev'essere sopratutto raffrontato col bacillo della tubercolosi, e vi trova delle analogie nel pleomorfismo e nelle proprietà di colorazione; nè vi trova marcate le differenze culturali: così, ad es., a proposito della mancata lentezza di sviluppo del bacillo della tubercolosi, in raffronto ai pseudo-tubercolari, ricorda che si possono avere culture di tubercolosi grassa (Arloing) o colture di bacilli tubercolari passati attraverso il corpo di

animali a sangue freddo (Lubarsch) o ingegnosamente praticate (Moeller), capaci di sviluppare facilmente a temperatura inferiore a 37 gradi.

A proposito della formazione della materia colorante, trova che Arloing l'ha determinata anche nelle culture di bacilli di Koch; e infine non è nemmeno completa la differenziazione, secondo l'opinione dello stesso Koch, rispetto al potere agglutinante delle culture, e ancora meno essa è rispetto alle lesioni anatomo-patologiche che determinano.

Ed ecco le conclusioni cui l'A. viene e che traduco letteralmente: « i bacilli resistenti agli acidi, che noi abbiamo studiato, costituiscono un gruppo vicino, per la forma, al bacillo della difterite e dell'*actinomyces*, per la forma e la proprietà di colorazione ai bacilli della lepra, dello smegma, del cerume; infine per tutti i loro caratteri, prossimi parenti del bacillo della tubercolosi umana e della sua varietà, ma non si potrebbe identificarli a quest'ultima specie »,

« E' per questo che noi abbiamo proposto di dare agli elementi costituenti questo gruppo il nome di *paratubercoli-bacilli* ».

Questo modo d'intendere le analogie dei bacilli acidoresistenti con gli altri bacilli e il posto che essi devono occupare nella sistematica generale, presenta in verità molte lacune e risente del preconcetto di vedere negli acidoresistenti caratteri molto prossimi e analogie molto affini col bacillo della tubercolosi di Koch.

Io non nego tali analogie e somiglianze, ma mi pare che sia troppo poco ricorrere, per dimostrarli, a tutti gli artifici di una tecnica raffinata, o a risultati isolati e non costanti. Così, ad es. la rapidità di sviluppo culturale, negli acidoresistenti è la regola, nella tubercolosi di Koch è solo una rara eccezione dovuta all'artificio; il potere cromogeno, negli acidoresistenti è costante (unica eccezione il bacillo tubercoloide di Beck, e il mio V) nel bacillo di Koch è la ingegnosità di Arloing che lo crea, e così via.

Nè per il posto che comunemente si assegna agli acidoresistenti nella sistematica generale, si può credere, come si dice, chiusa la discussione. Giacchè questi bacilli per certi caratteri starebbero fra il bacillo della difterite e l'*actinomyces*, per certi altri insieme coi bacilli della lepra, del cerume e dello smegma.

Io non potei avere, come già dissi, le culture del bacillo di Tavel, per certi naturali raffronti che avrei desiderato di fare, con i bacilli da me isolati dallo smegma di cane, ma non capisco perchè non si debba raggruppare questo bacillo al gruppo degli acidoresistenti, ma che invece se ne debba fare un gruppo a sè, a cui avvicinare gli altri acidoresistenti.

E allora resta ancora da domandarsi, se è proprio vero che tale gruppo (arricchito dalle specie suddette) sia da collocarsi fra il bacillo della difterite e il bacillo dell'*actinomyces*.

Fermandosi solo ai caratteri esteriori, veramente l'idea prima che si affaccia è proprio questa. Ma considerando la natura di questo gruppo di bacilli, il modo di comportarsi nei grassi, negli animali, al calore, ecc., tale soluzione semplicista del problema non soddisfa.

Invero, considerando soltanto i caratteri morfologici e culturali, noi anzichè mantenere l'autonomia del gruppo, per l'unico carattere dell'acidoresistenza, dovremmo dividerlo in *simil-difterici* e la maggior parte in *simil-streptothrix*.

Ma ciò sarebbe per lo meno ozioso, perchè già abbiamo rilevato i caratteri comuni che hanno gli acidoresistenti fra loro, conferenti autonomia al gruppo, mentre che i caratteri differenziali, che presentano le varie specie fra loro, sono piuttosto graduali e naturali passaggi.

Così gli acido-resistenti di Petri-Rabinowitsch e di Moeller (dalle graminacee) possono considerarsi come vere e proprie *streptothrix;* gli altri acidoresistenti non si allontanano dal tipo che gradatamente e quasi direi non sono che *streptothrix* bacilliformi.

Ed ecco la scala che si può stabilire:

1° Il bacillo di Petri-Rabinowitsch e il Grasbacillo II di Moeller.
2° Il timotheo bacillo.
3° Il V e il III Tobler.
4° Il IV *A* e il II Tobler; e I, II, III e IV mio.
5° Il IV *B* Tobler, il V mio.
6° Il I Tobler.
7° Il VI e il VII mio.

Ma tutto questo non riguarda che caratteri esteriori.

E' tempo ormai di affrontare la questione dal punto di vista più essenziale.

Già accennai che da due campioni di burro in cui avevo seminato la *streptothrix* Eppinger, e la *viridis*, ottenni due acidoresistenti alla distanza di 15 mesi da la semina.

Ex-Eppinger.

La forma è bacillare più o meno lunga, con presenza di filamenti ramificati e di elementi più corti ad estremità appuntite, analoga insomma a quella della maggior parte degli acidoresistenti, come sono analoghi il comportamento con i colori, le proprietà biologiche e le patogenetiche.

Su *agar* si presenta come una sottile patina bianco-sporca, umida, con superficie pieghettata e mamellonata e margini fini, seghettati e quasi trasparenti, invecchiando la cultura assume un leggero pigmento rosso-mattone, aderisce non molto fortemente al sustrato e si stacca con relativa facilità.

In *gelatina* non la liquefà e per infissione si sviluppa stentatamente e poco rigogliosamente, come pure stentatamente si sviluppa per strisciamento, formando una patina granulosa, biancastra, fortemente increspata, a margini netti e sinuosi.

In *brodo* sviluppa una pellicola che aderisce al vetro del tubo, con qualche grumo fluttuante, da essa si partono fiocchetti che si depositano al fondo lasciando il liquido limpido.

Su *patata* vegeta bene e forma coloniette rilevate, che aggruppate insieme costituiscono una patina di color bianco-rossastro.

Ex-viridis.

Forma, comportamento con i colori, biologia, analoghi al precedente.

Caratteri culturali. — *Agar glicerinato:* patina umida bianco-verdastra, sottile, liscia, con margini sinuosi, orlati; colonie facilmente staccabili e poco aderenti al sustrato nutritivo.

Gelatina: non la liquefà e per infissione sviluppa male lungo il canale d'innesto, coloniette granulose, bianche, puntiformi, che unite insieme dànno un aspetto omogeneo; per strisciamenti, patina culturale presso a poco analoga a quella su agar.

Brodo: lo intorbida con formazione di pellicola sottile superficiale, bianco-verdina, con qualche fiocco nuotante e sedimento biancastro al fondo, liquido limpido.

Patata: cresce bene con formazione di patina rugosa, biancastra, mamellonata, quasi asciutta.

***

Questi due acidoresistenti, nel burro in cui erano stati rispettivamente seminate due *streptothrix*, devono senza dubbio essere venuti o da un inquinamento accidentale, o da metamorfosi delle *streptothrix* seminate.

L'inquinamento accidentale non avrebbe potuto venire che dall'aria (e non dal burro stesso, stato all'epoca della semina sterilizzato); ora, come già dissi, dall'aria del nostro laboratorio non potei isolare mai acidoresistenti. Inoltre un inquinamento dall'aria avrebbe dato più facilmente, nei due campioni di burro, una unica specie di acidoresistente, e non due differenti, una cioè per campione.

E' degno di nota altresì il fatto, che delle *streptothrix* originarie seminate, non c'era più traccia nei due campioni di burro.

Per dimostrare la 2ª ipotesi, cercai anzitutto, con i metodi messi in opera per i comuni acidoresistenti, di riottenere dall'*ex-viridis* e dall'ex Eppinger, le *streptothrix* originarie.

A tal uopo praticai dei passaggi frequenti e alternati in agar e su patata, ma solo l'Eppinger, dopo il VI passaggio su patata acquistò l'aspetto non più uniforme con patina leggermente increspata, umida, bianco-rossastra; ma di colonia mamellonata, rilevata, bianco-opaca, asciutta, staccantesi a pezzi e con certa difficoltà; al microscopio si ha predominio delle forme filamentose ramificate, resistenti a tratti.

L'*ex-viridis*, come ebbi a dire a proposito dell'acido resistente IV, passata attraverso il corpo di un animale, si modificò e diede in cultura, una patina sottile, finamente granulosa, aderente al substrato, bianca, costituita da coloniette puntiformi, numerosissime, come polverulente, asciutte; ha in complesso l'aspetto di una varietà di *alba*, ma differisce dalle comuni albe, perchè è resistente agli acidi.

Da queste due *streptothrix*, provenienti dall'*ex-viridis* e dall'ex-Eppinger, non ho potuto riavere gli acidoresistenti primitivi, o più propriamente parlando, le *streptothrix* bacilliformi.

In conclusione, in due campioni di burro, in cui c'erano seminate due *streptothrix*, io ho trovato due forme a tipo bacilllare o acidoresistenti; da queste acidoresistenti ho potuto riavere due *streptothrix*, non del tutto simili alle originarie, ma molto somiglianti per peculiari caratteri culturali e morfologici e per il comportamento agli acidi; da queste ultime *streptothrix* non ho potuto più ricavare la forma bacillare.

Quindi si potrebbe dire fallita la controprova; ma per le leggi generali di filogenia, una varietà non ridà la specie progenitrice, e i ritorni atavici rappresentano sempre accidentalità, che non è possibile disciplinare.

E perciò a me parve preferibile ripigliare l'esperimento dapprincipio, per cercare di ottenere dalle comuni *streptothrix*, acidoresistenti; giacchè sono innegabili i rapporti di parentela intima, già dimostrati per i caratteri esteriori.

A tal uopo ho coltivato nel burro sterile le *streptothrix* Eppinger, *viridis*, alba, gialla; mantenendoli sempre a 37°; e di 15 in 15 giorni ho praticato piastre ed inoculazioni.

Già nel lavoro su citato, io ebbi opportunità di venire a conclusioni che credo opportune riportare brevissimamente.

Io ho potuto accertare che nei grassi, tutte le *streptothrix* subiscono importanti modificazioni morfologiche, spezzettandosi e assumendo una forma bacillare; tutte diventano resistenti agli acidi, anche quelle

che in cultura non sono; conservano la loro vitalità per lungo tempo, e attenuano il loro potere patogeno.

Nelle seminagioni praticate ora, io mi proposi soltanto il fine di indurre modificazioni tali nelle *streptothrix* da mutarle stabilmente in bacilli acidoresistenti; e perciò non tenni conto delle modificazioni che esse subiscono nei grassi e di cui, come dissi, mi son già intrattenuto.

Il risultato di questa serie di esperienze, non fu brillante, quale io speravo, perchè non potei spingere le modificazioni delle streptotricee al punto da me desiderato. Ciò forse è attribuibile alla relativa brevità di tempo (9 mesi) per cui io ho creduto conveniente di conservare i campioni per esaminarli più tardi.

Non si creda però che non si siano avuti risultati probativi:

Senza tener conto della conferma delle conclusioni sopra riportate; la serie è stata interessante anche e sopratutto per le modificazioni della *streptothrix* gialla, e in certo modo anche della Eppinger, mentre la *viridis* e l'altra si sono mostrate incomparabilmente più tenaci a conservare il propiio aspetto culturale.

Credo inutile esporre i dettagli di tecnica da me seguita, per le inoculazioni, le piastre e le culture.

I risultati sono stati i seguenti:

La *streptothrix* gialla già dopo il V mese, ha uno sviluppo su agar piuttosto stentato, con formazione di una patina uniforme liscia, con qualche lieve increspatura e qualche pieghettatura, umida, relativamente poco consistente, facilmente staccabile e spezzettabile, con margini sinuosi e lisci: il pigmento che la patina assume è giallo-cedrino.

Al microscopio non si vedono che forme di angoli tronchi e filamenti con brevi e rare ramificazioni vere, che si staccano ad angolo retto, forme bacillari più o meno lunghe, alquanto incurvate con estremità eguali appuntite, si vede raramente qualche forma clavata. Parziale resistenza agli acidi.

Fra una tipica *streptothrix* gialla e una *streptothrix* gialla bacilliforme, sono rilevabili le seguenti differenze:

Streptothrix gialla tipica.	*Streptothrix gialla modificata.*
Filamenti lunghi, ramificati, intrecciati.	Prevalenza di elementi corti e di forma y.
Caratteri biologici uguali.	Caratteri biologici uguali.
Resiste agli acidi a tratti.	Resiste agli acidi *in toto*, sopratutto gli elementi bacillari.
Su agar, colonie rilevate a capocchia di spillo, striate o ombellicate, o formazione di una patina giallastra con profonde e irregolari pieghettature ad increspi, aderente al substrato, staccabile con qualcho difficoltà e margini sinuosi irregolari.	Su agar, colonie pianeggianti poco consistenti, leggermente increspate, o patine sottili giallo-cedrine, increspate con margini lisci orlati, sinuosi, poco aderente al substrato e piuttosto molle.
In gelatina, non la fonde, patina quasi uguale a quella in agar.	Non la fonde.
Nel latte, non lo coagula, forma colonie isolate a grumi nuotanti alla superficie.	Nel latte non lo coagula e forma una pellicola giallastra nello strato cremoso.
Su patata, formazione di colonie mamellonate giallo-scuro, rossastre.	Su patata, patina uniforme, increspata giallo chiara.
In brodo, grumi nuotanti in superficie e sedimento biancastro, liquido limpido.	In brodo, pellicola superficiale, sedimento poco abbondante, il liquido limpido.

Quanto alla Eppinger le differenze furono meno marcate e si limitarono sostanzialmente ad un impallidimento del pigmento e alla diminuzione della consistenza delle patine culturali, che poco rigogliose erano quasi pianeggianti, uniformi, biancastre, con qualche rara colonia rilevata, convessa, senz'altri caratteri speciali.

Le modificazioni morfologiche consistevano sopratutto nella presenza di numerose forme bacillari accanto a forme filamentose, con ramificazioni brevi, resistenti parzialmente agli acidi.

***

In un'altra serie di esperienze ho cercato indurre modificazioni radicali nelle *streptothrix*, passandole in serie, attraverso il corpo degli animali di prova.

Le *streptothrix* che ho saggiate sono state la *viridis* e la Eppinger e ho praticato così:

1° Inoculazione sottocute di Eppinger e di *viridis* A;
2° » » del pus del coniglio A nel coniglio B;
3° » » del pus del coniglio B nel coniglio C e così via per un coniglio D, E, F.

Da questi saggi, quantunque all'esame diretto del pus la *streptothrix* apparisse spezzettata, in cultura acquistava l'aspetto tipico, anzi più rigogliosa e fortemente pigmentata, acquistava una maggiore virulenza.

Così mentre l'animale *A* morì in 17 giorni, gli animali *D*, *E*, *F* morirono da 3 a 5 giorni.

Ho cercato di modificare la *streptothrix* mercè l'essiccamento del pus in cui essa trovavasi: così il pus del coniglio *A* lo inoculai nel coniglio *B* dopo averlo completamente essiccato in stufa a 37° per 20 giorni (l'inoculazione la facevo includendo il pus essiccato e indurito in una sacca sottocutanea dell'animale), il pus del coniglio *B* nel coniglio *C* dopo averlo fatto stare 18 giorni in stufa, quello del *C* in *D* dopo averlo fatto stare 15 giorni a 37° e quello del coniglio *D* in *E* dopo di averlo fatto stare 10 giorni a 37°.

I risultati di questa serie sono stati anch'essi negativi, perchè le *streptothrix* hanno sempre conservato i loro caratteri.

E' degno di rilievo peraltro il fatto, che la vitalità del germe supera i limiti di essiccamento impiegati, e solo la virulenza si attenua alquanto, per l'azione deleteria dell'essiccamento prolungato al calore di stufa.

***

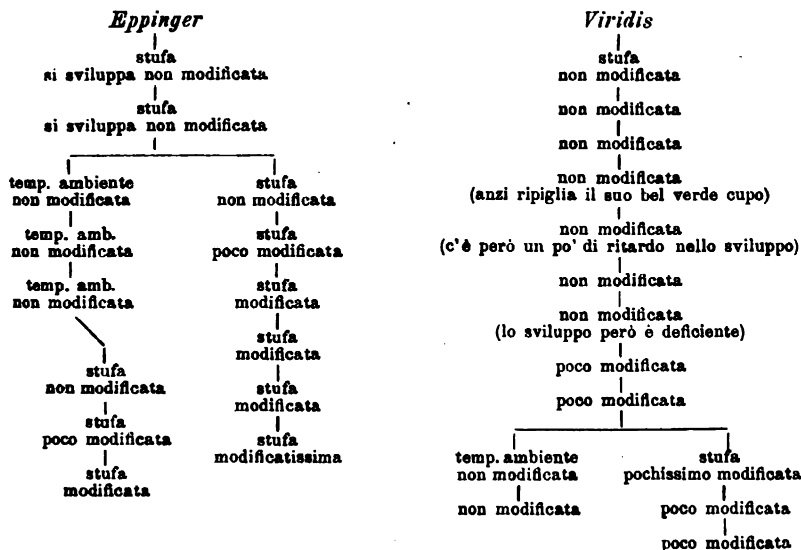
In un'altra serie di esperienze cercai di modificare le *streptothrix* trattandole direttamente col calore.

Questa serie mi ha dato i risultati immediati più importanti.

Procedetti così:

Una cultura di Eppinger o di *viridis* di 48 ore a 37°, la esposi per 2 ore alla stufa a 54°, indi praticai un secondo passaggio che lasciavo sviluppare alla temperatura ambiente, per esporlo indi per 2 ore alla stufa a 54° e fare così un terzo passaggio, e così di seguito per un 4°, 5°, ecc., passaggio.

Espongo nel seguente prospetto i risultati ottenuti:



Le modificazioni culturali per la Eppinger, consistettero dapprima in una attenuazione del tono del colore che si faceva sempre più pallido, fino a diventare bianco-sporco; in seguito lo sviluppo si faceva meno rigoglioso e le colonie non erano più rilevate, increspate, ombellicate, ma un poco convesse, quasi puntiformi, lisce, meno consistenti, umide, poco aderenti al sustrato nutritivo; le patine culturali poco sviluppate, piuttosto sottili, leggermente increspate con qualche colonia più rilevata, di color giallo arancio pallido, quasi biancastro, poco consistenti e poco aderenti.

Al microscopio non più i tipici filamenti intrecciati, ma filamenti piuttosto corti, con ramificazioni brevi e semplici, resistenti a tratti, mentre alcune forme bacillari resistono *in toto*.

Le modificazioni delle *viridis* si iniziarono come si vede dal diagramma molto più tardivamente e consistettero dapprima in un ritardo sensibile nello sviluppo e nella comparsa del pigmento, fino a scomparire del tutto e a diventare come un'*alba*, con coloniette piccole, minute, bianco-sporche, aderenti al sustrato.

Le modificazioni microscopiche non sono state molto appariscenti.

Ripetuto l'esperimento col calore per la gialla e per l'alba, ho notato: che per la gialla invece di avere un assottigliamento delle colonie, con attenuazione di pigmentazione, si ha dal quarto passaggio in poi, come un rammollimento della patina colturale, che diventa giallo-verdina, più sottile, più umida, più liscia e meno aderente al sustrato, talora con qualche increspatura e qualche colonia staccata rotondeggiante.

La *streptothrix* gialla però si mostra più delicata al calore delle precedenti *streptothrix*, e ben presto non si sviluppa più.

Microscopicamente si hanno press'a poco le stesse modificazioni della Eppinger, solo che i tratti resistenti sono più scarsi e si vedono come dei granuli resistenti agli acidi e molte guaine vuote.

La *streptothrix alba* non presentò al calore, nel suo aspetto esteriore, modificazioni molto evidenti, e all'azione prolungata di questo agente fisico o a temperatura alquanto più elevata non si sviluppa più.

***

Riepilogando, per dimostrare i rapporti dei bacilli acidoresistenti, con le *streptothrix* (il genere *actinomyces* di Gasperini) di cui sono forme derivate, io ho cercato:

1° di ottenere dagli acidoresistenti conosciuti l'aspetto di *streptothrix*; e per il bacillo della Rabinowitsch e i due bacilli di Moeller ho potuto procedere alla identificazione senza alcun artificio;

2° di riottenere dagli acidoresistenti *ex-viridis* ed *ex*-Eppinger le *streptothrix* da cui provenivano e da queste riavere quelli;

3° di spingere le modificazioni delle streptotricee, fino a ridurle a *streptothrix* bacilliformi, ossia acidoresistenti, *nei grassi*;

4° *nel pus* (questa prova è fallita);

5° mercè il calore.

***

Tali prove non potevano darmi uno degli acidoresistenti tipici, o nelle controprove, una delle *streptothrix* tipiche; perchè le condizioni dell'esperimento, non riproducono mai i lenti, misteriosi, continui, processi creativi della natura, che noi sorprendiamo solo negli effetti ultimi; — però esse mi han dato quanto bastava per dimostrare sperimentalmente i legami esistenti fra il genere *streptothrix* e il gruppo degli acidoresistenti propriamente detti, e intendere le somiglianze nei caratteri esteriori e nelle proprietà biologiche e patogenetiche.

In base a tali prove, pare a me che si possa, con maturità di giudizio, affermare che messe le *streptothrix* in certe condizioni speciali, si modificano in modo da avvicinarsi distintamente agli acido-resistenti — e viceversa questi, nella maggior parte, si avvicinano distintamente alle streptothricee.

E se a questo punto ricordiamo, che vi sono acidoresistenti (Rabinowitsch e i due Moeller) che per l'aspetto sia culturale, sia microscopico, ecc., si possono considerare come vere e proprie *streptothrix*, si sarà trovato l'anello che congiunge la catena di filiazione.

***

Quali rapporti corrano fra gli *acidoresistenti* e il bacillo della tubercolosi umana, l'abbiamo in parte accennato; e sebbene le analogie che si son volute vedere, ci paian molto semplici, pure, oltre la comune reazione colorante (che sarebbe troppo poco) oltre le analogie anatomo-patologiche (esistenti anche con un altro bacillo, l'*opale agliaceo* (42), che non può ascriversi al genere di cui ci siamo occupati) — analogie basate essenzialmente su caratteri esteriori; — a me pare che fra il bacillo della tubercolosi di Koch e i pseudo-tubercolari o acidoresistenti, ci sian rapporti naturali, analoghi a quelli che esistono fra le specie di uno stesso genere, o meglio fra le specie discendenti da unico stipite.

I rapporti fra acidoresistenti e bacillo della tubercolosi aviaria,

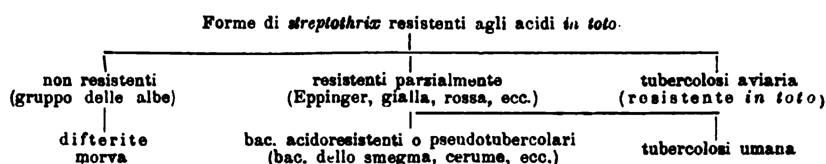
bovina, bacillo della difterite, ecc., s'intendono anche, sol che si pensi che tutte queste specie appartengono o derivano dalla grande famiglia delle streptothricee.

Del resto non è opera sistematica che ho inteso fare, dimostrando la dipendenza o la filiazione del gruppo degli acidoresistenti, dalle *streptothrix*; essendo il problema più complesso e generale.

La proprietà di resistere agli acidi che si credeva esclusiva dei bacilli della tubercolosi, dello smegma, della lepra, del cerume e, recentemente (1896) di alcuni altri bacilli, chiamati appunto *acidoresistenti*, la possiedono la maggior parte delle *streptothrix*, come già ebbe a osservare anche Fuchs (45).

Anzi su tale proprietà il prof. Sanfelice fondò la sua opportuna classificazione delle streptotricee, della quale mi valgo, per dimostrare il modo come vanno considerati gli acidoresistenti o *streptothrix* bacilliformi, nonchè il bacillo della tubercolosi, ecc., stabilendo il seguente:

Albero genealogico.



Questo quadro riassume quanto ho detto intorno alla natura degli acidoresistenti, al posto che loro spetta nella sistematica, e ai rapporti che hanno con gli altri bacilli.

In esso il bacillo della tubercolosi umana si vede legato a quello della tubercolosi aviaria e alle *streptothrix* resistenti parzialmente; ciò perchè esso può derivare direttamente dalle forme resistenti *in toto* o dalle forme resistenti parzialmente. In questa seconda ipotesi avrebbe un'origine comune con gli acidoresistenti e quindi vincoli di parentela ancora più stretti.

* * *

Intorno alla proprietà di resistere agli acidi, che i bacilli acidoresistenti hanno comune con alcune *streptothrix*, col bacillo delle tubercolosi, ecc., molto si è detto.

Bulloch (43) ha dimostrato che il bacillo Timoteo di Moeller, come il bacillo della tubercolosi, conteneva degli acidi grassi e della cera, oltre i corpi proteici e le sostanze chitinoidi.

La cera ottenuta da questi due bacilli resisteva a la decolorazione con gli acidi e i bacilli privati di questa cera non resistevano più al-l'azione decolorante.

Aronson (44) attribuisce anch'egli la reazione colorante del bacillo della tubercolosi, a sostanze ceree, o più propriamente ad alcool superiori, entranti nella costituzione di queste sostanze.

Ho potuto ottenere artificialmente la *resistenza agli acidi* coltivando in terreni grassi germi che prima non la presentavano. E per le osservazioni fatte ho escluso che il fenomeno dipendesse da adesione di grasso al corpo bacterico, perchè io passavo i preparati, prima di colorarli, nello xilolo, nel cloroformio e nell'alcool per un tempo relativamente lungo, e perchè il grasso avvolgente a mo' di capsula il corpo bacterico non fa prendere ordinariamente al protoplasma bacterico nessuno colore *a freddo* mentre i preparati a freddo che faceva per controllo, dopo il trattamento con lo xilolo, ecc., si colorivano bene con la fucsina carbolica.

Ho escluso altresì che potesse trattarsi di molecola grassosa, penetrata come tale nel corpo bacterico, perchè i bacilli non utilizzano nei grassi, che le scarse sostanze proteiche che vi si trovano.

Ho creduto in conseguenza di attribuire il fenomeno a una costituzione del protoplasma bacterico, paragonabile, sino a un certo punto, a quel che avviene negli istociti, quando *s' iniziano* i fenomeni di degenerazione grassa: in altri termini l'acido-resistenza non è dovuta a grasso di provenienza esogena, ma a una sostanza grassa formatasi per processi metaplastici nel protoplasma bacillare.

E certamente la sostanza acidoresistente, *nei bacilli acidoresistenti*, è una sostanza grassa, simile ad adipocera, molto analoga a quella che Koch e Aronson han trovato nel bacillo tubercolare, e Bulloch per il Timoteobacillo.

Ho praticato il metodo Geppert per una *streptothrix* (Eppinger) e due acidoresistenti (il Tobler V e il mio V).

I risultati furono incerti, forse per insufficienze tecniche, perchè goccioline di liquido oleoso, simile a grasso, si separarono dal solo mio acidoresistente V; — mentre che l'acido osmico ha dimostrato la nota reazione nera in tutti e tre i bacilli — e molto più semplicemente, tutti e tre i bacilli impiegati, dànno l' unto, emulsionati sul vetrino in una goccia d'acqua.

Ma quale significato biologico bisogna dare a la presenza o a la formazione di questa sostanza acidoresistente?

Il dott. Cao isolò dal terreno una varietà di B. sottile, molto grosso, con segmenti parzialmente resistenti agli acidi, come se fossero spore.

Tali porzioni resistenti non avevano forma definita, collocate senza regola al centro o ad una delle estremità dei segmenti bacillari, il cui protoplasma residuale era incoloro o in completo sfacelo, lasciando una guaina vuota, raggrinzata e rifrangente. Nel bacillo giovane si vedevano solo granuli, acidoresistenti.

L'esame a goccia pendente, la coltivazione del bacillo a 42° dimostrarono non trattarsi assolutamente di spore.

Così per una varietà di megaterio trovata accidentalmente: non sono spore, questi granuli resistenti, ma potrebbero essere o protoplasma che si prepara a sporificare o più facilmente protoplasma sporigeno abortito.

Da questi fatti mi pare dimostrato che il protoplasma resistente agli acidi ha indubbiamente una costituzione bio-chimica particolare, cui non si può dare significazione biologica particolare, a meno che non si voglia, in queste accertate modificazioni protoplasmatiche, riconoscere l'equivalente della sporificazione, il che però non è ancora chiaramente dimostrato.

BIBLIOGRAFIA.

1. POTET. *Etude sur les bactéries dites « acidophiles »*. Paris, Baillière et fils, 1902.
2. RAPPIN e HEUROT. *Bacilli acidoresistenti nei sifilitici*. Semaine médicale, n. 14, p. 113, aprile 1903.
3. DE SIMONI. *Sulla presenza di bac. pseudo-tubercolari nel secreto delle otiti medie purulente croniche*. Gazzetta medica di Milano, agosto 1902.
   ID. *Bacilli resistenti agli acidi nel secreto ozenatoso*. Milano, tip. Riformatorio del patronato, 1903.

3-*bis*. DE SIMONI e ROVIDA. *Sulla presenza di bacilli pseudo-tubercolari nella patina dentale e nella saliva degli individui sani*. Milano, tip. Cogliati, 1903.

4. BECK. *Zur Frage der säurefesten Bazillen*. Tuberkulose-Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1905, pag. 145.
5. PETRI. *Zum Nachweis der Tuberkelbacillen in Butter und Milch*. Hyg. Rundschau, 15 ag. 1897.
6. RABINOWITSCH. *Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Marktbutter*. (Zeitschr. f. Hyg. 1897, vol. XXVI, p. 90).
7. KORN. *Zur Kenntniss der säurefesten Bakterien*. Centralb. f. Bakt., I parte, vol. XXV, 1899, p. 532.
8. HERBERT. *Untersuchungen über das Vorkommen von Tuberkelbacillen in der Marktbutter*. 1899, Edito da Alb. Lembach, Braunschweig.
9. RUBNER citato da POTET a pag. 16.
10. OBERMÜLLER. *Ueber Tuberkelbacillenbefunde in der Marktbutter*. Hyg. Rund. 1895, n. 19, p. 877.

11. HORMANN und MORGENROTH. *Ueber Bakterienbefunde in der Butter* (Hyg. Rund. 1898, n. 5, pag. 217).

12. MORGENROTH. *Tuberkelbacillen und Pseudo-tuberkelbacillen in Milch und Milchprodukten.* Edito da Mittler und Sohn, Berlino, 1899.

13. COGGI. *Sulla presenza di bacilli tubercolari nel burro del mercato di Milano.* Giorn. della R. Soc. d' Ig., luglio 1899, n. 7, p. 289.

14. GARDENGHI citato da FOLLI.

15. GRASSBERGER. *Ueber die nach intraperitonealer Injection von Marktbutter,* ecc. (Munchen. medical Wochensch., marzo 1899, n. 11, p. 341.

16. BECK. *Experimentelle Beiträge zur Untersuchung über die Marktmilch.* Deutsche Vierteljahrsschrift f. offentliche Gesundheitspflege, 1900, fasc. 3, p. 430.

17. CARNEVALI. *Sui bacilli della pseudo-tubercolosi del latte e del burro.* Questi Annali, vol. X, 1900, fasc. 4, p. 470.

18. SANTORI. *Sulla frequenza del bacillo tubercolare nel latte di Roma,* ecc. Questi Annali, fasc. X, 1900, p. 301.

19. TOBLER. *Beiträge zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen,* ecc. (Zeitsch. f. Hyg. und Inf. XXXVI, gennaio 1901.

20. MARKL. *Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Wiener Marktbutter und Margarine.* Wiener Kl. Wochensch., marzo 1901, n. 10, p. 242.

21. MOELLER. *Ueber die Beziehungen der Tuberkelbacillen zu den andern säurefesten Bakterien zum Strahlenpilze.* Centr. f. Bakt., parte I, vol. XXX, 1901, n. 14, p. 513. Rapporto al Congresso di Londra 1901.

22. JONG. *Ueber den Fund von säurefesten Tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen bei einer nicht Tuberkulösen Mastitis.* Zeitsch. f. Fleisch. und Milchhyg., 1901, p. 345.

23. BINOT citato da POTET al Cap. VIII, pag. 77 e seg.

24. HERR. *Das Pasteurisieren des Rahms als Schütz gegen die Verbreitung der Tuberkelbacillen durch Butter.* Zeitsch. f. Hyg., 1901, fasc. I, p. 182.

25. KARLINSKI. *Zur Kenntniss der säurefesten Bakterien.* Centr. f. Bakt., parte I. vol. XXIX, aprile 1901, n. 12, p. 521.

26. STOLZ. *Ueber einen Bacillus mit Verzweigungen.* Arch. f. Hyg., volume XXX, 1897, p. 156.

27. DIETRICH. *Säurefeste Bakterien in einer vereiterten Ovarialkyste.* Berl. Kl. Wochensch., 1899, vol. XXXVI. n. 9, p. 189.

28. LASER. *Ueber das Verhalten von Tiphusbacillen,* ecc. Zeitsch. f. Hyg., vol. X, 1891, p. 513.

28-*bis*. CZAPLEWSKI. *Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum.* Centr. f. Bakt., I parte, nov. 1890, n. 22 e 23, p. 685 e 717.

29. MIRONESCU. *Ueber das Vorkommen von Tuberkelähnlichen Bakterien in menschlichen Fäces.* Zeitsch. f. Hyg., 1901, vol. XXVII, p. 497.

30. FLEXNER. *Pseudo-tuberculosis hominis streptothrica.* Journal of exp. Med. III, 1898 e Bulletin of the Johns Hopkins hospital, Baltimora, giugno 1897, n. 75, p. 128.

31. PAPPENHEIM. *Befund von Smegmabacillen in Menschlichen Lungenauswurf.* Berliner Klin. Woch., settembre 1898, n. 37, p. 809.

32. RABINOWITSCH. *Befund von säurefesten Bakterien bei Lungengangrän.* Deut. med. Woch., aprile 1900, vol. I, n. 16.

33. Folli. *Bacilli resistenti agli acidi nella gangrena*. Riforma med., 27 agosto 1901, anno XVII, p. 591.
34. Courmont e Descos. *Culture liquide omogenee e mobilità dei bac. acidoresistenti*. Semaine médicale, n. 49, p. 401, 3 dic. 1902.
35. Lombardo-Pellegrino. *Comportamento delle streptothricee, ecc. nei grassi*. Questi Annali, 1904, p. 533.
36. Mayer. *Zur histologischen Differentialdiagnose der säurefesten Bakterien aus der Tuberkulosegruppe*. Virchow's Archiv., vol. CLX, 1900, p. 324.
37. Lehmann e Neumann. *Bakteriologie und bakteriologische Diagnostik*. München. Edito da Lehmann.
38. Hölscher. *Experimentelle Untersuchungen mit säurefesten Tuberkelahnlichen Spaltpilzen*. Lavori dell' Istituto di Patologia di Tübingen, 1901.
39. Moeller. *I bacilli pseudo-tubercolari, il loro potere patogeno*. Soc. di Med. int. di Berlino. Seduta del 3 febbraio 1902. Semaine médicale, n. 7, p. 53, 12 febbraio 1902.
40. Lehmann e Neumann. Loc. cit.
41. Potet. Loco citato a p. 183.
42. Vincenzi Livio. *Sul decorso della pseudo-tubercolosi per ingestione del bac. opale agliaceo*, ecc. Gazz. degli Ospedali, n. 133, anno 1904.
Lombardo Pellegrino. *Sulle morti spontanee*. Rivista d' Igiene, 1906.
43. Bulloch citato da Potet a p. 184.
44. Aronson. *Su la causa delle reazioni coloranti del bac. della tub*. Semaine médicale, n. 24, p. 199, giugno 1902.
45. Fuchs. *Ueber Färbbarkeit der Streptotricheen nach Methoden der Tuberkelbacillenfärbung*. Centralbl. f. Bakt., Vol. 33, pag. 649, a. 1903.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA III.

Fig. I. — Cultura su agar-glicerinato di 15 giorni del bacillo pseudotubercolare N. I.

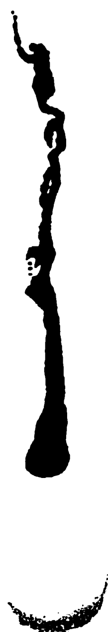
Fig. II. — Cultura su agar-glicerinato di 20 giorni del bacillo pseudotubercolare N. II.

Fig. III. — Cultura su agar-glicerinato di 20 giorni del bacillo pseudotubercolare N. III.

Fig. IV. — Cultura su agar-glicerinato di 20 giorni del bacillo pseudotubercolare N. IV.

Fig. V. — Cultura su agar-glicerinato di 7 giorni del bacillo pseudotubercolare N. V.

Fig. VI. — Cultura su agar-glicerinato di 7 giorni del bacillo pseudotubercolare N. VI.



1.



2.



3.



4.



5.



6.

Istituto d'igiene della R. Università di Messina

Del passaggio dei germi del suolo attraverso l'intestino dei lombrici

Ricerche del dott. **GIUSEPPE GUARGENA**, assistente volontario.

Il suolo, quale fonte principale di moltissimi germi, ha giustamente attratto l'attenzione di molti ricercatori. Ed invero l'importanza etiologica d'uno dei più vasti ambienti, in cui l'uomo vive, non è certamente poca, poichè essa è quella che ci guida alla profilassi.

Ma lo studio del suolo presenta non poche difficoltà, potendosi esso trovare nelle più svariate condizioni, poichè va soggetto all'influenza degli agenti fisici, chimici, biologici, i quali ne mutano incessantemente la composizione, costituendo per tal modo un substrato vario ai germi che in esso si trovano, e tale che questi possano subire modificazioni di vitalità, di virulenza, non indifferenti. Epperò non hanno certamente fatto bene quei ricercatori che hanno studiato il suolo conducendo le loro esperienze su terreno sterile, e così, destituendo uno dei principali agenti, qual'è quello biologico, hanno diminuito di molto l'importanza delle loro ricerche.

Inoltre, perchè lo studio del suolo possa farsi in modo completo, è necessario anche di studiare quale funzione esercitino i moltissimi e svariatissimi animali che in esso vivono, poichè certamente essi vi debbono concorrere non poco nel lavorio biologico che continuamente si svolge nel suolo.

Nel prefiggermi di studiare quale interesse potessero destare dal punto di vista igienico i lombrici per rispetto ai germi che si trovano nel suolo, ho voluto condurre tutte le mie esperienze su terreno non sterilizzato.

Ho studiato dapprima la flora bacterica dell'intestino dei lombrici presi da vari terreni, per metterla a raffronto con quella dei terreni stessi, in cui essi vivevano. Indi ho ricercato se dei germi seminati in terreni non sterilizzati fossero capaci di passare inalterati o no attraverso l'intestino dei lombrici In terzo luogo ho voluto ricercare se i lombrici fossero capaci di trasportare a distanza i germi, che col terreno introducono nel loro intestino.

I lombrici su cui ho esperimentato (*Lumbricus terrestris albus* e *niger*) furono raccolti parte nel Villaggio Gazzi, parte nel Villaggio Santo (due sobborghi del comune di Messina) e parte nella Villetta Mazzini, uno dei giardini pubblici della Città.

***

Prima serie. — Ho raccolto in tre vasi distinti il terreno e i lombrici delle tre località or indicate. Il terreno del Villaggio Gazzi, da cui furono presi i rispettivi lombrici, era argilloso, non coltivato, umido, essendo in vicinanza ad un rigagnolo. Quello del villaggio Santo era marnoso, prevalentemente calcareo, anch'esso non coltivato ed umido: i lombrici ivi raccolti presentavano, a differenza di quelli di Gazzi, che erano bruni, un colorito più chiaro (grigio sporco). Il terreno della Villetta Mazzini era coltivato e ricco di *humus:* i lombrici non differivano da quelli del Villaggio Gazzi.

Tecnica. — In questa prima serie di ricerche ho proceduto in maniera assai semplice. Ogni giorno prendevo in esame il terreno e un lombrico di un vaso, in modo che in tre giorni erano esaminati successivamente i tre terreni dei tre vasi e tre lombrici rispettivi, il quarto giorno poi ricominciavo col vaso esaminato il primo giorno, e così di seguito.

Per esaminare il terreno lavavo ripetutamente il lombrico in diversi tubi di acqua sterile facendolo passare da un tubo all'altro, poi seminavo una o due anse della prima acqua di lavaggio sia in tubi di agar che di gelatina e ne facevo culture piatte in scatole di Petri.

Per esaminare il contenuto intestinale del lombrico, dopo aver lavato ben bene l'animale, nel modo che ho detto poc'anzi, lo ponevo vivo sopra una tavoletta, indi lo sezionavo facendo con piccole forbici sterilizzate alla fiamma un'incisione che comprendesse tutte le parti molli tranne dell'intestino. Fatto ciò dissecavo da questo le parti molli e ne rivoltavo i lembi sulla tavoletta fissandoli con spilli; per tal modo rimaneva scoperto l'intestino ancora integro. Sterilizzavo allora nuovamente alla fiamma le forbici e la pinzetta e procedevo all'apertura del tubo gastro-intestinale, raccoglievo con un'ansa di platino sterilizzata un po' di contenuto intestinale e lo emulsionavo in acqua sterile, indi seminavo una o due anse di questa emulsione sia in tubi di agar che di gelatina e ne facevo colture piatte in scatole di Petri.

I germi che ho trovato constantemente nell'intestino dei lombrici e nel terreno sono:

a) per il Villaggio Gazzi: il *b. fluorescens liquefaciens* e il *non liquefaciens*, il *proteus vulgaris*, dei *vibrioni*, dei *tifosimili*, dei *colisimili*, il *b. del pseudo-edema maligno*, dei *similcarbonchio*, dei *cocchi*;

b) per il Villaggio Santo: dei *similcarbonchio*, dei *colisimili*, dei *tifosimili*, il *b. del pseudo-edema maligno*, un *b. pseudo-difterico*, il *proteus vulgaris*, delle *streptothrix*, dei *cocchi*;

c) per la Villetta Mazzini: dei *similcarbonchio*, dei *cocchi*, il *proteus vulgaris*, dei *colisimili*, dei *tifosimili*, il *b. del pseudo-edema maligno*, delle *streptotricee*, degli *ifomiceti*.

I microrganismi patogeni che ho riscontrato sono:

a) per il Villaggio Gazzi: un similcarbonchio trovato nell'intestino di un lombrico, un vibrione isolato tanto dal terreno che dal contenuto intestinale di un lombrico, una varietà di b. del pseudo-edema isolato sia dal terreno che dall'intestino dei lombrici, un bacillo che, per quanto mi sappia, non è stato ancora descritto e che ho denominato pseudo-tubercolare per la proprietà di resistere agli acidi, isolato dall'intestino di un lombrico;

b) per il Villaggio Santo: una varietà di b. del pseudo-edema maligno isolato tanto dal terreno che dal contenuto intestinale dei lombrici, una streptothrix e un similcarbonchio isolati entrambi dall'intestino dei lombrici;

c) per la Villetta Mazzini: una varietà molto tozza di b. del pseudo-edema maligno e dei cocchi, isolati tanto dal terreno che dal contenuto intestinale dei lombrici.

***

Dei germi isolati, di cui ora ho fatto cenno, mi sembra opportuno dare una descrizione sommaria, soffermandomi specialmente sui patogeni e su quelli che per i loro caratteri culturali destano un certo interesse. Descriverò prima i germi isolati dal contenuto intestinale dei lombrici e poi quelli isolati dal terreno delle tre località suddette.

GERMI ISOLATI DAL CONTENUTO INTESTINALE DEI LOMBRICI.

1. *Tre varietà di similcarbonchio.* — Ho indicato queste tre varietà con le lettere *A*, *B*, *C*.

L'A., isolato dall'intestino di un lombrico del Villaggio Gazzi, è un bacillo molto grosso, simile a quello del carbonchio, ma alquanto più

tozzo e con estremità leggermente arrotondate. Si dispone in catene di 2, 4, 6 individui, è lentamente mobile, piglia il Gram. Le spore non differiscono da quelle del carbonchio. Su gelatina, in colture piatte, dà colonie giallastre, umidicce, circolari, a margini leggermente seghettati e nel centro della colonia notasi un rilievo ombelicato, da cui partono a mo' di raggi delle pieghe dirette verso la periferia. La gelatina è fusa molto lentamente.

Le colture in agar per strisciamento dànno una patina giallastra, umidiccia, di uno splendore quasi perlaceo, essa si distacca facilmente dal substrato. Su patata dà una patina molto simile. Non intorbida il brodo, ma dà un precipitato fioccoso. Inoculato sotto cute o in giugulare a delle cavie, queste muoiono dopo 3-4 giorni senza alterazioni importanti, se tolgasi un modico tumore di milza. Fatte colture dalla milza e dal sangue del cuore si isola il bacillo in coltura pura. Non è patogeno per i conigli.

Il *B*, isolato dall'intestino di un lombrico del Villaggio Santo, è più grosso e meno corto del precedente. Morfologicamente si avvicina moltissimo al bacillo del carbonchio. Si dispone in catene più o meno lunghe, ha movimenti vivaci, sporifica presto, prende il Gram. Su gelatina dà colonie a superficie zigrinata e a margini finamente seghettati. Al microscopio la colonia ha l'aspetto del Caput-Medusae. Fonde rapidamente la gelatina. Lo sviluppo in agar per strisciamento dà una patina asciutta, un po' aderente al substrato, grossolanamente pieghettata, di colorito grigiastro, ma col tempo ingiallisce e colora in bruno il substrato. Su patata dà patina asciutta, grigiastra, con pliche evidentissime. Intorbida il brodo dando precipitato fioccoso; più tardi si va formando una patina alla superficie del brodo, intanto che questo chiarifica. Inoculato sotto cute alle cavie dà edema gelatinoso sottocutaneo, milza modicamente ingrossata, contenuto addominale siero-ematico, emorragie puntiformi sul peritoneo. Il bacillo si isola in coltura pura dall'edema gelatinoso sottocutaneo, dalla milza, dal contenuto addominale e dal sangue del cuore. Non è patogeno per i conigli.

Il *C*, isolato dall'intestino di un lombrico della Villetta Mazzini, nelle colture giovani si presenta al microscopio in forma di filamenti lunghissimi variamente intrecciantisi fra loro.

I filamenti sono costituiti da catene di individui, i quali, nelle culture vecchie, si distaccano e compariscono per lo più isolati, raramente in catene di due, hanno la forma simile a quella del carbonchio, se non che le estremità sono alquanto arrotondate. Ogni individuo poi porta due spore in modo da venire a costituirsi verso il centro, dall'uno e dall'altro lato, come un incavo, sicchè il bacillo assume la figura di un 8 in cifra. Nelle colture ancora più vecchie le due spore si distaccano e si allontanano in modo che si vedono una gran quantità di spore isolate. Il bacillo è immobile. Nelle colture in gelatina dà una colonia rigogliosa a margini rilevati e irregolari ed è percorsa in tutti i sensi da pieghe; — il colorito è grigio sporco tendente al violaceo. — Nelle colture per strisciamento in agar dà una patina asciutta nel sito dove è avvenuto l'innesto e non si espande mai su tutta la superficie del substrato; è spessa, a margini rilevati, si distacca completamente dal substrato a lembi ampii ed è molto compatta e resistente; le pliche piuttosto sottili sono per lo più trasver-

sali. Più tardi la patina diventa di un colorito grigio sporco, umidiccia e colorisce in nero il substrato. Le colture su patate danno una patina molto spessa a margini rilevati, di colorito grigio sporco, e colorisce in nero intenso il substrato. Il brodo non è intorbidato ed alla superficie dà patina sottile che va presto al fondo formando un precipitato fioccoso. Questo bacillo non è patogeno nè per le cavie, nè per i conigli.

Vari autori hanno descritto dei bacilli similcarbonchio con proprietà patogena o immunizzante. Così Hüppe e Cartwright Wood hanno descritto un bacillo molto simile a quello del carbonchio con proprietà immunizzanti contro il carbonchio. Il Klein (1) ne ha isolato un altro dal sangue di una vacca ritenuta morta di carbonchio e che da lui fu denominato *bacillus sessilis* per il suo modo di comportarsi nella sporificazione. Burri (2) ne isolò uno simile al *bacillus subtilis*. Schulz (3) ne isolò un altro dal latte di una capra malata. Il Giannone (4) descrisse un similcarbonchio patogeno con reperto anatomo-patologico caratteristico. Ottolenghi (5) descrisse tre bacilli similcarbonchio patogeni, che distinse con le lettere *A*, *B*, *C*, e ritenne che il bacillo *A* fosse un carbonchio attenuato e che i bacilli *B* e *C* fossero delle forme di passaggio tra il bacillo sottile e il carbonchio.

Dei bacilli da me isolati l'*A* e il *C* per le loro proprietà culturali e morfologiche non si possono per nulla riaccostare ad alcuno dei bacilli descritti dai suddetti autori, il *B* si può invece avvicinare, specie per il reperto anatomo-patologico, al bacillo descritto da Giannone.

2. *Bacillo pseudo-tubercolare*. — Isolato da me dall' intestino di un lombrico del villaggio Gazzi, questo bacillo fu anche studiato dal dott. Lombardo, a cui ho permesso un passaggio da una mia coltura, avendo egli delle ricerche da fare sui bacilli pseudo-tubercolari.

Morfologia. — Facendo un preparato da una colonia recentemente sviluppatasi in agar o gelatina, al microscopio si osservano bacilli che rassomigliano molto ad un similcarbonchio, si colorano uniformemente col bleu di metilene e con la fucsina carbolica, non si uniscono per lo più in catene, qualche volta a due. Facendo un preparato con la colorazione Ziehl-Gabbet si notano alcuni di questi bacilli coloriti in bleu, altri in rosso; questi sono più rari, ma hanno la stessa forma di quelli. Se si fa un preparato da una coltura meno giovane, sempre col metodo Ziehl-Gabbet, si nota che i bacilli presentano spazi chiari e tratti oscuri, questi intensamente coloriti in rosso hanno l'aspetto di una forma bacillare molto tozza con estremità arrotondate, quelli invece si coloriscono in bleu molto sbiadito. Accanto a queste forme si trovano forme degenerate molto grosse, deformate, non resistenti agli acidi.

Caratteri culturali. — Lo sviluppo in gelatina è lento e dà colonie circolari dapprima di colorito gialliccio, che poi passa al giallo oro, indi al giallo aranciato e infine diventa rosso corallo La colonia al centro è rile-

(1) Centralbl. f. Bakter., 1889, VI Bd., p. 813.
(2) Higien. Rundschau, 1894, p. 339.
(3) Centralbl. f. Bakter., 1901, p. 582.
(4) Istituto d' Igiene di Palermo, vol. 5°, 1899-900.
(5) Estratto dagli Atti della R. Accad. dei Fisiocritici. Serie IV, vol. 15°.

vata, come ombelicata. Attorno a questa porzione centrale rilevata si nota una porzione intermedia piana a cui segue il tratto più esterno sottile, quasi iridescente e con margini finamente seghettati. Il tratto intermedio e quello più esterno sono inoltre attraversati da strie finissime che vanno dal centro alla periferia a mo' di raggi. L'aspetto generale poi di tutta la superficie della colonia è finamente granuloso, aspetto che si accentua sempre più a misura che la colonia invecchia e che diventa asciutta assumendo un bel colore rosso corallo. Osservando al microscopio questa colonia, si nota una porzione centrale di forma circolare e di colorito giallo chiaro uniforme. Attorno a questa una porzione intermedia più oscura e finamente granulosa, come se fosse cosparsa di finissima arenula nera su fondo giallastro. La periferia è più chiara e meno granulosa. I margini chiari sono irregolari, seghettati e alquanto granulosi. Inoltre si notano delle strie più chiare che si alternano con strie più oscure e che vanno tutte dal centro alla periferia a mo' di raggi. La gelatina non è fusa.

In agar questo bacillo ha uno sviluppo piuttosto lento, si sviluppa più rapidamente nel termostato a 37° dove vuole almeno 36 ore. La colonia in agar, piccola e rotonda se profonda; piatta, circolare e alquanto rilevata al centro se superficiale, è umida, di colorito giallo chiaro nei primi giorni, colorito che poi passa al giallo oro, indi al giallo arancio e invecchiando diviene asciutta, granulosa e di colorito rosso corallo. La coltura per strisciamento su agar glicerinato dà in principio una patina umida di colorito giallo molto chiaro, indi passa per tutte le gradazioni del giallo fino all'aranciato e in fine diviene asciutta, granulosa, di colorito rosso corallo. Lo stesso si osserva su gelatina.

Su patata avvengono gli stessi mutamenti di colore, se non che qui si nota che quando la coltura invecchia e diventa perciò asciutta, granulosa e di colorito rosso corallo, sui granuli cominciano ad apparire dei bellissimi ed elegantissimi punticini bianchi, i quali piccoli dapprima e distanti fra loro, vanno dopo ingrandendosi e confluendo fra loro in modo da dare in ultimo una patina asciutta, bianco-lattea, granulosa, molto elegante.

Le colture in brodo dànno dapprima alla superficie una patina giallognola, che ben presto precipita al fondo formando un precipitato che passa per tutte le gradazioni del giallo per assumere in fine il colorito rosso-corallo. Il brodo non viene intorbidato.

Patogenicità. — Questo bacillo non è patogeno per i conigli. Solo iniettato in giugulare in dosi molto elevate riesce a farli morire dopo parecchi giorni di cachessia per azione delle proteine bacteriche.

Inoculato in addome nelle cavie dà la morte in quarta o sesta giornata con alterazioni di peritonite ad essudato fibrino-purulento sui vari organi, specialmente sull'albuginea dei testicoli.

Anche iniettato per altre vie è capace di uccidere le cavie in tempo più o meno breve, ma senza alterazioni anatomiche importanti, se tolgasi un modico tumore di milza

3. *Colisimili.* — Fra i molti colisimili isolati dall'intestino dei lombrici sono degni di menzione un patogeno e non gassogeno, e tre varietà patogene gassogene, che sono anche molto frequenti nel terreno. Queste tre varietà sono da riportarsi ad un unico tipo sia per i caratteri culturali che per le alterazioni anatomo-patologiche.

Similcoli patogeno non gassogeno. — Isolato dall' intestino di un lombrico della Villetta Mazzini. E' un bacillo corto ad estremità arrotondate (cocco-bacillo), mobile, non prende il Gram Coltivato in gelatina dà una colonia circolare sottile con rilievo centrale e riflessi iridescenti alla periferia. Le colture per infissione non dànno sviluppo di gas. Coltivato su agar per strisciamento dà una patina biancastra iridescente. Su patate invece una patina grigio-giallastra, densa, umida, lucida Intorbida uniformemente il brodo dando un precipitato bianco al fondo della provetta e una pellicola esile alla superficie.

E' patogeno per le cavie, le quali muoiono in terza-quarta giornata di setticemia.

4. *Tifosimili. Tre varietà di b. del pseudo-edema maligno* (1). — La prima varietà, isolata da un lombrico di Gazzi, è un similtifo molto corto, gassogeno, anaerobio facultativo.

La seconda varietà, isolata dal contenuto intestinale di un lombrico del Villaggio Santo, è un similtifo gassogeno meno corto del precedente, anch'esso anaerobio facultativo.

La terza varietà, isolata dall' intestino di un lombrico della Villetta Mazzini, è un similtifo gassogeno ancora meno corto e più sottile, tale da accostarsi per la forma al bacillo del tifo. E' anaerobio facoltativo.

Queste tre varietà, benchè differiscano un po' nella morfologia, sono poi eguali nei caratteri culturali e nella loro azione patogena. Le cavie inoculate sotto cute muoiono in seconda-terza giornata con caratteristico edema siero-sanguinolento sottocutaneo e discreto tumore di milza. Il bacillo si isola dall'edema siero-sanguinolento, dalla milza, dal sangue del cuore, ecc.

5. *Radiciformi.* — Si isolano con frequenza dall' intestino dei lombrici, ma hanno poca importanza non essendo patogeni.

6. *Proteus vulgaris.* — L'ho isolato con una certa frequenza dall'intestino dei lombrici. Non patogeno.

7. *Fluorescens liquefaciens e non liquefaciens.* — Isolati con frequenza. Nessuna varietà patogena.

8. *Vibrione patogeno.* — Fra i vari vibrioni isolati, ne ho trovato uno patogeno nel contenuto intestinale di un lombrico del villaggio Gazzi. E' un bacillo piccolissimo, curvo, mobilissimo, anaerobio facultativo. Inoculato in addome nelle cavie dà peritonite con essudato siero-purulento, dal quale si isola il bacillo.

9. *Streptothrix albido-flava patogena.* — Isolata una sola volta da un lombrico del villaggio Santo, non è resistente agli acidi, ha le estremità libere rigonfiate a clava. In agar sviluppa colonie presso che circolari, pianeggianti verso la periferia, in tutto il resto rilevate a pliche sottili confluenti verso il centro come tanti raggi di cerchio. Nelle colture per strisciamento le colonie confluiscono fra loro e formano come delle colonie più grandi a margini merlati. La patina rilevata a pliche è lucida, di color gialliccio, difficilmente distaccabile dal substrato. Nelle colture per infissione in gelatina, questa è fusa lentamente e a strati.

Le colture in brodo dànno fiocchetti sferici isolati, i quali dapprima

---

(1) SANFELICE. Questi Annali, 1895.

stanno sospesi nel substrato, ma col tempo precipitano in fondo alla provetta. Il brodo non viene intorbidato.

Le colture su patata non hanno nulla di caratteristico.

Inoculata in addome nelle cavie dà peritonite, simile a quella prodotta dal bacillo tubercolare.

10. *Streptothrix viridis.* — Isolata dal contenuto intestinale di un lombrico della villetta Mazzini, è resistente agli acidi. La colonia su agar o su gelatina si presenta perfettamente circolare con 3 o 4 strie rilevate anch'esse circolari e concentriche. Le colture per strisciamento su agar dànno una patina di color verde-chiaro tendente un po' al giallo e con pliche trasversali. Invecchiando la coltura si copre di un sottile strato bianco. Fonde a strati e lentamente la gelatina. E' patogena per le cavie.

11. *Oidium.* — Dai lombrici del villaggio Gazzi ne ho isolato due varietà, che si differenziano fra loro solo per i caratteri morfologici. L'uno si presenta in filamenti molto grossi e tozzi, non uniformemente colorati, poichè si notano dei tratti di forma ovale intensamente colorati, forme che si osservano anche isolate. L'altro ha filamenti un po' più sottili e più lunghi ed organi di fruttificazione presso che rotondi. Non sono patogeni.
un bacillo di varia lunghezza, con forme tozze e forme lunghe. Col bleu

12. *Pseudodifterico.* — Isolato da un lombrico del villaggio Santo, è un bacillo di varia lunghezza, con forme tozze e forme lunghe. Col bleu di metilene presentano la colorazione bipolare. Nelle colture vecchie si notano molte forme clavate. Su agar le colture per strisciamento dànno una patina bianca, asciutta, lucente, quasi madreperlacea, leggermente granulosa e aderente al substrato. Non è patogeno.

13. *Cocchi.* — Fra i cocchi ne ho isolato due specie non patogene e tre patogene.

I cocchi non patogeni sono: il *cinnabareus* e lo *stafilococco cereo-flavo*, il primo isolato da un lombrico di Gazzi, e il secondo da un lombrico della villetta Mazzini.

I patogeni sono: lo *stafilococco piogene albo*, il *cereo-albo*, il *micrococcus roseus*, tutti isolati da lombrici della villetta Mazzini.

14. *Ifomiceti.* — Fra gli ifomiceti ho potuto isolare l'*aspergillus flavescens* e il *tricothecium roseum* dai lombrici della villetta Mazzini.

Germi isolati dal terreno.

1. *Similcarbonchio.* — Di parecchie varietà di similcarbonchio trovate nel terreno, la più importante è una varietà del tutto identica al similcarbonchio *A* che ho già descritto parlando dei germi isolati dall'intestino dei lombrici. Questa varietà patogena l'ho trovato nel terreno del villaggio Gazzi. Le altre due varietà (*B* e *C*), isolate dall'intestino dei lombrici, non ho potuto riscontrarle nel terreno.

2. *Colisimili.* — Anche nel terreno ho riscontrato, del pari che nel contenuto intestinale dei lombrici, un similcoli patogeno non gassogeno, del tutto identico a quello che ho già descritto sopra.

3. *Radiciformi.* — Nel terreno sono più costanti che nell'intestino dei lombrici.

4. *Tifosimili.* — Ho isolato tre varietà di bacilli del pseudoedema maligno identiche a quelle isolate dall'intestino dei lombrici e che ho già descritte.

5. *Proteus vulgaris.* — Si trova costante nel terreno assai di più che nell'intestino dei lombrici. Non ho riscontrata alcuna varietà patogena.

6. *Fluorescens liquefaciens* e *non liquefaciens.* — Nel terreno sono meno frequenti che nel contenuto intestinale dei lombrici. Nessuna varietà patogena.

7. *Vibrioni.* — Ne ho isolato parecchi, di cui una varietà patogena identica a quella già trovata nell'intestino dei lombrici di Gazzi. I vibrioni sono più frequenti nel terreno.

8. *Streptothricee.* — Ho isolato parecchie varietà di *streptothrix alba,* ma nessuna ne ho riscontrato patogena.

Ho poi isolato una *streptothrix flava* coi caratteri comuni e non patogena. Infine ho isolato una *streptothrix,* credo, non ancora stata descritta e che ho denominato:

9. *Streptothrix nigrico-flava.* — E' una varietà di *streptothrix,* che per il colorito della patina si avvicina alla flava e per il colorito del substrato alla nigra.

Coltivandola in brodo dapprima si notano dei fiocchetti grigiastri sospesi nel liquido, il quale non viene per nulla intorbidato; in seguito il brodo si va colorando in nero che si fa via via più intenso pur rimanendo limpido, intanto che i fiocchetti precipitano al fondo della prevetta. Facendo una coltura per infissione in gelatina, questa fonde lentamente e a strati formando colonie di colorito giallo-scuro e il substrato assume una tinta nerastra che col tempo diventa sempre più intensa, intanto che le colonie galleggianti nel liquido si vanno coprendo di uno straterello bianco polverulento che va sempre più indurendo e cementando fra loro le colonie in modo da costituire alla superficie come una patina resistente.

Su agar forma una patina asciutta, rilevata a pieghe eleganti e con tendenza a crescere in spessore più che a diffondersi sul substrato. Il colorito della patina è giallo-scuro (quasi *terra di Siena*). Il substrato si colorisce dapprima in nero non molto intenso e come sfumato, poi diviene via via più intenso fino ad assumere una tinta perfettamente nera. Più tardi man mano che la coltura va invecchiando, il colorito della patina si fa sempre più oscuro con tendenza al violaceo intanto che si ricopre di un sottilissimo strato polverulento bianco-violaceo. Dopo un certo tempo alcuni punti della patina assumono il colorito caratteristico della streptothrix nigra; questi punti si vanno sempre più ingrandendo in modo che quasi tutta la patina diviene di un nero intenso.

Su patata subisce presso a poco le stesse modificazioni. La patina dapprima di colorito giallo-scuro diviene di colorito grigio-sporco intanto che il substrato si va colorendo in nero; indi il colorito della patina passa al violaceo e il substrato si colorisce sempre più in nero. Infine alcuni punti della patina divengono perfettamente neri e tutta la patina si va poi coprendo di uno strato biancastro polverulento.

Questa streptothrix non resiste agli acidi. Non è patogena nè per le cavie, nè per i conigli.

10. *Oidium.* — Ho isolato dal terreno le stesse due varietà già descritte per l'intestino dei lombrici.

11. *Pseudo-difterico.* — Identico a quello descritto parlando dei germi isolati dall'intestino dei lombrici.

12. *Cocchi.* — Fra i cocchi ho isolato:

a) il *micrococcus roseus* — patogeno;
b) il *cinnabareus* — non patogeno;
c) lo *stafilococco cereo-flavo* — patogeno;
d) lo *stafilococco cereo-albo* — non patogeno;
e) lo *stafilococco piogene albo* — patogeno;
f) la *sarcina lutea* — non patogena;
g) la *sarcina aurantiaca* — non patogena.

13. *Ifomiceti.* — Tra gli ifomiceti ho isolato dal terreno: il *penicillium glaucum*, l'*aspergillus niger*, l'*aspergillus flavescens*, già descritto, e il *tricothecium roseum*, anch'esso cennato parlando dei germi isolati dall'intestino dei lombrici.

***

Da questa rapida rassegna dei germi isolati dal terreno e dal contenuto intestinale dei lombrici si può inferire che la flora bacterica è svariatissima e che tanto per i germi patogeni che per i non patogeni non si nota alcuna importante differenza, trovandosi quelli dello intestino anche nel terreno, se tolgansi una varietà di similcarbonchio patogena, una streptothrix patogena e un bacillo pseudo-tubercolare patogeno, trovati in più nell'intestino dei lombrici. Ma ciò non può autorizzarci a dire che le specie patogene dell'intestino dei lombrici siano più numerose di quelle che si trovano nel terreno, poichè se i similcarbonchio sono germi costanti del terreno e del contenuto intestinale dei lombrici, non così può dirsi delle streptothrix e dei pseudo-tubercolari, che vi si trovano solo eccezionalmente.

Ma se non vi è alcuna differenza qualitativa importante fra le specie dei microrganismi del terreno e quelle del contenuto intestinale dei lombrici, vi è però una differenza nella quantità. Difatti, mentre basta prendere una sola ansa di contenuto intestinale di un lombrico, emulsionarla in cmc. 10 di acqua sterile e seminare poi un'ansa di questa emulsione in agar per vedere sviluppare un gran numero di colonie, p. es. di colisimili o di tifosimili; d'altra parte anche se si prendono parecchie anse di terreno, si emulsionano in cmc. 10 di acqua sterile e poi si seminano parecchie anse di questa emulsione in agar, le colonie di tifosimili e di colisimili che si svilupperanno saranno di gran lunga inferiori per numero: — e ciò costantemente. E questa differenza è spiegabile pel fatto che i germi nel terreno subiscono le influenze degli agenti fisico-chimici, in virtù dei quali il terreno tende a depurarsi dai germi medesimi (1), mentre nel lombrico pare che alcuni

(1) Soyka. *Die Selbstreinigung des Bodens.*

germi — come i colisimili, i tifosimili, il pseudo-edema maligno — trovino un terreno adatto per moltiplicarsi. Sicchè, in base al criterio già espresso, da questa prima serie di ricerche si può concludere:

1° che i *fluorescens liquefaciens* e non *liquefaciens*, i quali si trovano con molta frequenza nei terreni umidi, si notano costantemente con più frequenza ed abbondanza nel canale alimentare dei lombrici;

2° che i protei e i vibrioni sono invece più abbondanti e più costanti nel terreno;

3° che i tifosimili e i colisimili, come pure il pseudo-edema maligno, sono molto più abbondanti nell'intestino dei lombrici;

4° che i similcarbonchio pare siano più costanti nel terreno, e così pure i cocchi, le streptotricee e gl'ifomiceti.

***

SECONDA SERIE. — Nella seconda serie di esperienze, come ho già detto, mi son proposto di studiare se i microrganismi, seminati in terreno non sterilizzato, siano capaci di passare inalterati nell'intestino dei lombrici. A tal uopo ho fatto esperimenti con un *prodigioso patogeno*, il *piocianeo*, lo *stafilococco citreo*, il *carbonchio*, gli *sputi tubercolari*.

Tecnica. — In vasi distinti, ripieni di tereno e con entro dei lombrici, seminavo separatamente le diverse emulsioni dei germi suddetti costituite di due anse di cultura in cmc. 20 di acqua sterile; e poi di 5 in 5 giorni facevo colture piatte sia dal terreno che dal contenuto intestinale dei lombrici. Indi dalle une e dalle altre isolavo, appena sviluppatisi, i germi su cui esperimentavo e ne facevo inoculazioni nelle cavie e nei conigli per saggiarne la virulenza. E' da notare che le esperienze fatte col carbonchio comprendono quelle condotte con le spore, seminate nel terreno in emulsione con le stesse norme di tecnica che per gli altri bacilli, e quelle condotte con gli organi carbonchiosi (fegato, milza, sangue), seppelliti nel vaso ripieno di terra a cm. 20 dalla superficie. Inoltre volendo saggiare la virulenza del carbonchio in associazione con gli altri germi del suolo, inoculavo direttamente negli animali un'emulsione del terreno o del contenuto intestinale dei lombrici.

Per quanto riguarda poi le esperienze fatte con gli sputi tubercolari, quivi procedevo in modo diverso. Emulsionavo parecchie anse di sputo in cmc. 20 di acqua sterile e poi versavo l'emulsione nel vaso di terreno dove stavano i lombrici. Di 5 in 5 giorni esaminavo al microscopio tanto il terreno che il contenuto intestinale dei lombrici, facendo preparati con la doppia colorazione Ziehl-Gabbet. Questo metodo mi ha giovato molto, poichè non è tanto difficile distinguere i bacilli tubercolari dai pseudotubercolari che si possono trovare nel terreno o nel contenuto intestinale

dei lombrici, e ciò anzitutto per la forma, la quale, se ben si osservi, è un po' diversa, e poi anche perchè la frequenza con cui si notano al microscopio i bacilli tubercolari seminati è di gran lunga superiore alla rara accidentalità con cui capita normalmente osservare un bacillo resistente agli acidi nel terreno o nell'intestino dei lombrici.

Dalle esperienze fatte è risultato:

1. Che il prodigioso passa morfologicamente inalterato nell'intestino dei lombrici fino al trentacinquesimo giorno dalla sua semina nel terreno. Dopo non mi è stato più possibile di rintracciarlo sia nel terreno che nel tubo intestinale dei lombrici. Per quanto riguarda la virulenza ho potuto constatare, che prima della semina era così tenue che le cavie inoculate sotto cute anche a dosi elevate, morivano di setticemia dopo 4-5 giorni, invece dopo 2-3 giorni dalla semina, mentre il prodigioso del terreno conservava la stessa virulenza di prima, quello del contenuto intestinale dei lombrici inoculato anche a dosi piccole e a cavie di maggiore peso dava la morte dopo 24-36 ore dalla inoculazione. Più tardi, verso l'ottavo o decimo giorno, la virulenza del prodigioso isolato dal terreno si poteva dire la stessa di quella del prodigioso isolato dal lombrico. Come riprova di questo fatto ho attenuato il prodigioso da me adoperato nelle esperienze sottoponendolo alla temperatura di 50° C. per un'ora, alla quale temperatura il prodigioso perde quasi la sua virulenza, che riacquista invece in grado elevato appena lo si fa passare attraverso il tubo alimentare dei lombrici, anche inoculandolo direttamente per la bocca del verme.

2. Che il piocianeo, dotato di una discreta virulenza, l'ho potuto isolare dal terreno e dall'intestino dei lombrici anche dopo un mese dalla semina. Per quanto riguarda la virulenza non ho notato differenza rilevante fra il piocianeo del suolo e quello del contenuto intestinale dei lombrici.

3. Che lo stafilococco citreo l'ho potuto seguire fino al sedicesimo giorno, dopo del quale è scomparso sia dal terreno che dal contenuto intestinale dei lombrici. La pochissima virulenza che aveva prima della semina venne completamente perduta: la esercitava solo in associazione con altri cocchi.

4. Che seminando spore di carbonchio le cavie inoculate, sia con una emulsione del terreno che con una del contenuto intestinale dei lombrici, muoiono in 2ª-3ª giornata d'infezione mista, cioè di carbonchio e di pseudo-edema maligno, con prevalenza, nei primi giorni, dello pseudo-edema e in seguito con prevalenza del carbonchio, il che viene provato tanto dal reperto anatomo-patologico, come dall'isolamento dei due bacilli dagli organi e dal sangue del cuore. Difatti nei

primi giorni l'edema gelatinoso sottocutaneo delle cavie morte è prevalentemente siero-sanguinolento, quale si verifica nell'infezione per pseudo-edema maligno, in seguito esso è proprio caratteristico del carbonchio; inoltre dagli organi e dal sangue del cuore si isolano i due bacilli in modo che nei primi giorni, mentre nelle piastre scarseggiano le colonie di carbonchio, in seguito queste sovrabbondano su quelle dello pseudoedema.

5. Che le spore di carbonchio passano nell'intestino dei lombrici e vi resistono, come anche nel terreno, per moltissimo tempo, avendo trovato il germe vivo e virulento per oltre tre mesi.

6. Che gli organi carbonchiosi (fegato, milza, reni, cuore, sangue), seppelliti a 20 cm. dalle superficie del suolo, si comportano allo stesso modo delle spore, cioè dando una infezione mista di carbonchio e di pseudoedema, con prevalenza di questo nei primi giorni, in seguito con prevalenza del bacillo del carbonchio. Se non che vi è da notare che dopo quaranta giorni dal seppellimento degli organi nel terreno, la morte degli animali inoculati, sia col terreno che col contenuto intestinale dei lombrici, avviene sempre per infezione mista, ma con prevalenza dello pseudo-edema, come nei primi giorni. Infine al 45° giorno gli animali muoiono di solo pseudoedema. Questo fatto si potrebbe spiegare coll'ammettere che lo pseudo-edema in presenza di organi carbonchiosi in putrefazione esalti la sua virulenza in modo da agire più prontamente dello stesso carbonchio. Difatti mentre l'infezione mista prima della 45ª giornata faceva morire le cavie dopo 2-3 giorni dalla inoculazione, alla 45ª giornata, seguendo la morte per solo pseudoedema, questa avveniva dopo 24-48 ore al più.

7. Che i bacilli del carbonchio nel terreno sporificano presto e le spore ben presto passano nell'intestino dei lombrici, poichè avendo sottoposto ad una temperatura di 70° C. per mezz'ora una emulsione di terreno e un'altra di contenuto intestinale dei lombrici e avendo inoculato le due emulsioni a delle cavie, queste morirono dopo due giorni, quasi contemporaneamente, di carbonchio. E ciò anche dopo 24 ore dal seppellimento degli organi carbonchiosi nel terreno.

8. Che i bacilli della tubercolosi resistono molto tempo nel terreno e passano morfologicamente inalterati nell'intestino dei lombrici. Io li ho potuto seguire fino a oltre due mesi.

***

TERZA SERIE. — Nella seconda serie si è visto come i germi adoperati negli esperimenti erano tutti capaci di passare dal terreno nell'intestino dei lombrici. Or, nella terza serie, ho voluto studiare se i

lombrici fossero capaci di trasportare a distanza questi stessi germi, tosto che fossero penetrati nel loro tubo alimentare.

Tecnica. — Dopo aver fatto dimorare i lombrici per alcuni giorni nel terreno, dove era stato seminato un dato microrganismo, li lavavo ben bene e ripetutamente in acqua sterile e poi li mettevo in un vaso contenente terreno comune dove non era stato seminato alcun germe.

Dopo qualche giorno esaminavo il terreno col solito metodo, cioè emulsionando una certa quantità di terreno in acqua sterile, seminando alcune anse della emulsione in agar e facendo delle colture piatte, allo scopo di poter isolare il germe trasportato dal lombrico e constatare perciò la sua presenza nel terreno. Nel tempo stesso esaminavo il contenuto intestinale dei lombrici con le stesse norme di tecnica.

Dalle esperienze fatte è risultato:

1. Che il prodigioso può essere trasportato a distanza dal lombrico, e quindi inquinare il suolo dove il prodigioso non si trovava, anche dopo 24 ore dal trasporto, e mentre dopo un giorno il germe trasportato si trova tanto nel terreno che nel contenuto intestinale del lombrico, al 2° o 3° giorno esso si trova stentatamente nel contenuto gastro-enterico del verme e con facilità invece nel terreno.

2. Che lo stesso debba dirsi per il piocianeo, se non che questo germe si trova anche parecchi giorni dopo dall'epoca del trasporto ancora nel contenuto intestinale dei lombrici.

3. Che lo stafilococco citreo si comporta allo stesso modo del prodigioso.

4. Che per ciò che riguarda le spore di carbonchio e gli organi carbonchiosi possono i lombrici trasportare a distanza le spore e inquinare il suolo. Con ciò viene a confermarsi quanto ha sostenuto il Pasteur (1) a riguardo delle infeziosità del suolo di località nelle quali erano stati interrati dei cadaveri carbonchiosi. Il che è stato del resto anche confermato dal Feltz (2) e dal Bollinger (3) e non certamente escluso dallo stesso Koch (4), il quale aveva cercato di menomare la importanza di tale trasporto.

5. Che anche i bacilli di Koch contenuti negli sputi tubercolari che inquinano il suolo possono essere trasportati a distanza dai lombrici.

---

(1) Bulletin de l'Académie de médecine, 1881.
(2) Comptes rendus XCV.
(3) *Arbeiten aus dem patholog. Institute in München*, 1886.
(4) *Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte I.*

***

Dal complesso del lavoro risulta principalmente:

1. Che la flora bacterica che si trova nell'intestino dei lombrici, non differisce essenzialmente da quella del terreno in cui essi vivono.

2. Che alcune specie di microrganismi sono assai più frequenti e molto più abbondanti nell'intestino dei lombrici che nel suolo, ed altre invece sono più costanti e in maggior quantità nel terreno.

3. Che il passaggio dei germi del suolo attraverso l'intestino dei lombrici oltre che dalla somiglianza delle due flore scaturisce dal fatto sperimentale che seminando nel terreno dei microrganismi, questi si riscontrano anche nell'intestino dei lombrici.

4. Che il prodigioso patogeno passando attraverso l'intestino dei lombrici esalta la sua virulenza.

5. Che i lombrici sono capaci di trasportare a distanza i germi patogeni che pigliano da un suolo infetto e di andare perciò ad inquinare un suolo non infetto, costituendo così un veicolo d'infezione.

Istituto d'Igiene della R. Università di Messina

Sull'azione tossica dei prodotti della putrefazione di alcune sostanze alimentari

pel dott. prof. **FORNARIO,**

Direttore del grande Ospedale civico di Messina.

I.

I processi chimico-parassitari in correlazione alla costituzione delle sostanze alimentari diverse e loro condizione d'integrità od alterazione sono stati in tempi recenti oggetto di ricerche analitiche svariate. Mentre da un lato si studiavano i diversi fattori delle energie chimiche delle sostanze alimentari, traducendole in elementi produttori di calorie, si ricercavano dall'altro canto quelle alterazioni chimiche o biochimiche intrinseche agli alimenti o provocate da germi che alterandone la costituzione nel lavorio di disintegrazione davano nuovi prodotti con proprietà diverse e talora nocive.

Tutta la serie di lavori a questo ultimo intento diretti può suddividersi, da un lato in ricerche puramente chimiche, dall'altro lato in ricerche parassitarie o miste.

Naturalmente il campo che prima e più attirò l'interesse dei ricercatori, per le alterazioni della compagine costitutiva degli alimenti e sostanze organiche in generale, fu il processo più classico della decomposizione organica, cioè il processo di putrefazione.

Sarebbe inopportuno riandare tutta la storia di tale studio, assai ben fatta dal Roger nella Patologia generale del Bouchard.

E' bene però rilevare come tutti i ricercatori dei molteplici prodotti del lavoro di putrefazione, ritennero innocui i gas, gli acidi grassi, i corpi

amidati; ritennero nocive per possibile importanza tossica le sostanze albuminoidee e le basi. Per queste sono da annoverare tra le basi tossiche a formula chimica nota la colina per le carni e pesci in putrefazione (Brieger), la collidina per le carni putrefatte e pel cadavere umano (Brieger), la ganidina dalle feci dei colerosi e pesci guasti (Brieger), la corintina pei polpi marini (Oesch e Corninck), la metilganidina, la trietilmetilamina, la metilganidina pei pesci guasti (Brieger),

Esistono inoltre una quantità di ptomaine mal definite e note solo per la loro azione fisiologica, come la ptomaatropina da carni e pesci, la ptomato-curarina (da lievito putrefatto, Hackay), la tirotoxina (da latte e formaggio guasti), la criptomaina (da funghi guasti).

Accanto a queste esiste una quantità di basi non tossiche, quali la neuridina, la saprina, la cadaverina, la putrescina, la metilamina, la trimetilamina e l'etilendiamina.

Furono così esaminati dal punto di vista chimico i prodotti della putrefazione dei cadaveri umani, delle carni dei pesci, dei polpi, del latte, del mais, dei funghi.

Tutte queste sostanze hanno una costituzione molto instabile, variano grandemente secondo le condizioni di temperatura, di luce, di aerazione, di terreno, di tempo.

Di tutte queste sostanze la più gran parte è ad azione convulsivante, quale la trietilamina, la idrocollidina, la collidina, la morruina, la nevrina, la corintina; la più parte delle quali basi dànno miosi e salivazione, con disturbi respiratorii e morte con cuore in diastole. Altre basi hanno azione stupefacente e paralitica, quali la putilamina, la metilganidina, la ganidina, cui talvolta si accompagna midriasi.

La produzione di questi prodotti deve essere in buona parte effetto dell'azione di microrganismi, ma è difficile dire se la trasformazione della Colina ed altre basi sia anche dovuta all'azione riduttiva dei tessuti che acquistano una grande energia dopo la morte.

Circa la flora batterica presente e partecipante ai processi della putrefazione è tuttora difficile precisare quali e quante specie vi piglino parte, malgrado le numerose ricerche.

Anche nella questione più generica, se cioè nei processi di putrefazione prevalessero gli anerobii (Pasteur, Bienstock, Tissier e Martelly) o gli aerobii (Brieger, Fränkel, Flügge, Macé), non ancora fu definita la diversa compartecipazione.

E' un fatto che dalla scoperta del *Proteus* questo fu ritrovato il più frequentemente in tutte le sostanze in putrefazione, sia animali (Monti e Tirelli) sia vegetali (Santori).

Schrank, studiando la putrefazione dell'uovo di pollo, stabiliva che solo il *Proteus* era atto a indurre in esso processi di dissoluzione, altri microrganismi non attecchivano (*B. megaterium*, *piocianeus*, radiciforme, *prodigiosus*, cianogeno) e vi perivano.

Foà e Bonome, confermando le ricerche dell'Hanser, riuscirono ad immunizzare gli animali con culture di *Proteus* e con miscela di nevrina e muscarina.

Il Carbone dalle culture di *Proteus* otteneva le basi di coline, etilendiamina, ganidina, trimetilamina ed immunizzava contro il *Proteus* gli animali di esperimento con la colina ottenuta dalle culture e colla muscarina.

Il Sanfelice, nello stesso tempo, studiava l'azione dei saprogeni aerobii e anerobii. Faceva larga parte al *Proteus* fra gli aerobii, perchè costante, perchè gli altri diversi microrganismi trapiantati nelle sostanze in putrefazione vi morivano, nè in culture di sostanza organica davano luogo a decomposizione con odore putrido. Rilevava l'importanza degli anerobii, ne descriveva 9 specie di cui quattro fondenti e cinque no; quattro di essi li identificava col *Clostridium foetidum*, col *B. liquefaciens* di Luderitz, col *B. spinosus*, col *Radiatus;* gli altri descriveva come specie nuove.

Nel 1902 Tissier e Martelly isolavano dalla fibrina in putrefazione tra gli aerobii facoltativi il *Micrococcus flavus*, il *Diplococcus griseus non liquefaciens* (specie nuova), lo streptococco piogeno, lo stafilococco albo, il *B. coli*, il *B. filiformis*, il *Proteus*. Tra gli anerobi isolavano il *Diplococcus magnus anerobius* e il *gracilis putridus* (entrambi specie nuove), il *B. putrificus coli*, il *B. perfringens*, il *B. bifermentans sporogenes*. Stabilivano che tutti i fermenti della putrefazione formano due gruppi principali: fermenti misti e fermenti semplici.

Tra tutti i fermenti le specie essenziali per dislocare le molecole albuminoidee e produrre una putrefazione tipica sono i proteolitici veri, misti o puri. E tra le diverse diastasi la più attiva è quella del *B. putrificus coli*.

Tutto il processo della putrefazione può quindi essere distinto in due fasi. Prima fase dei fermenti misti, i quali distruggono lo zucchero e attaccano le albumine per poi distruggere le proteosi, dando l'ammoniaca necessaria ad alcalinizzare il mezzo. Seconda fase dei fermenti puri, i quali completano l'attacco delle albumine e dei loro derivati ultimi. Così alla putrefazione concorrono gli anerobii e aerobii, i quali nella loro simbiosi danno la putrefazione più completa, ma e gli uni e gli altri potrebbero dare da soli la putrefazione (della fibrina) compresi gli aerobii soli, quali lo stafilococco albo e forse il *Proteus* (Tissier e Martelly). E' tuttavia a notare dal punto di vista della tossicità che il *B. putrificus*, il quale tra tutti avrebbe la diastasi più attiva per la putrefazione, non è tossico, nè patogeno (Bienstock, Tissier e Martelly).

Tra quelli che studiarono l'azione dei prodotti putridi nell'organismo animale oltre il Seybert, lo Stich ed altri, fra i più prossimi a noi furono il Rovighi ed il Frisco. Questi si servì solo dell'infuso di carne e di mais, provocando fatti convulsivi ed alterazioni epatiche e renali, e col mais alterazioni anche del sistema nervoso.

A questi risultati abbastanza esaurienti pei processi di putrefazione della carne in generale bisogna aggiungere i risultati di tutt'altra serie di lavori provenienti da ricerche occasionate da avvelenamenti di singoli o più individui, a forma epidemica, per ingestione di alimenti guasti. Tra questi vanno aggruppati tutti i casi di avvelenamenti da carne, i più numerosi (carni salate, carni insaccate, carni in scatola), gli avvelenamenti da pesce, sardine in scatole, *Mytilus*, ostriche, uova, latte, formaggio e funghi.

Tutti questi casi sono veramente la più parte assai più casi di infezioni con auto-intossicazioni, come ebbe a rilevare il Basenau per le carni, anzi che casi di vere intossicazioni. E tutti poi possono essere distinti in tre

gruppi: quelli in cui i microrganismi ritrovati non furono identificati; quelli in cui i microrganismi ritrovati furono identificati cogli ordinari saprofiti; infine quelli assai più numerosi che furono identificati ai bacilli del gruppo dei paratifi, quali il B. di Gärtner, di Fischer, ecc. Vanno tra queste accennate le epidemie del Klein, del Glücksmann, del Ben Haus, di Schröder e Pfühl, in cui furono trovati il *Proteus* e batterii della putrefazione e i lavori di Karlinski, Gaertner e Jon Holst, Kaensche, Günther, Fischer, Basenau, Schöttmuller, Trautmann, in cui si ritrovarono le forme di paratifi, tra i quali tutti verrebbero dal Trautmann aggruppati il B. di Gaertner, di Van Ermengen, di Fischer, di Kaensche, il *Morbificans Bovis* e alcune forme di Coli, fondando le affinità sul criterio dell'agglutinazione.

Casi più speciali di avvelenamento per diverse altre sostanze alimentari sono rari. Sono tuttavia registrati alcuni casi di avvelenamento per sardine in scatole (Seguillon).

Un'epidemia per avvelenamento di pesci è quella descritta d'Arstamoff, di 11 persone con 5 morti dall'uso di salmone. Alla apparenza non esisteva alcuna traccia di putrefazione. Furono trovati micro-organismi nelle carni dell'animale. Le culture erano patogene pei gatti, cani, topi e producevano tossine.

Casi particolari di avvelenamento per polpi non ho riscontrato. Sono invece registrati casi di avvelenamento da ostriche e casi di avvelenamento da *Mytilus*. Il Brieger avea estratto dal *Mytilus* una *toxina* ed una *toxina* (ptomatocurarina) era stata estratta da Salkowski da un caso di avvelenamento per *Mytilus* occorso a Virchow, ma nulla di più speciale fu sinora determinato, nè se la presenza di queste tossine fosse connessa alla presenza di microorganismi e quali. Lo stesso può dirsi per casi di avvelenamento da ostriche. Le forme cliniche però sviluppatesi in questi casi con strabismo, diplopia, fenomeni gravi nervosi, ricordano un poco la sindrome del B. di Van Ermengen.

Casi diversi d'intossicazione sono quelli riferiti per avvelenamento di latte, cacio e crema.

I fenomeni sono analoghi. Ad essi è stata imputata qualche epidemia di colera *nostras*. La toxina isolata sarebbe la tyrotoxina. I casi riferiti sono quelli di Vaugham, di Wallace, di Axel Holst, di Waughin. I prodotti chimici delle putrefazioni oltre la tyrotoxina sarebbero la trimetilamina, la neuridina. I fermenti della putrefazione del latte sarebbero la più parte dei fermenti misti della putrefazione, di quelli sopratutto che attaccano il lattosio, sdoppiandolo e precipitano e sciolgono la caseina come il *B. putrificus*, oltre la produzione di lipasi per la saponificazione dei grassi.

Infine i casi di avvelenamenti da funghi sono attribuiti ai veleni inerenti alle specie velenose *Amanita muscarina*, *Amanita phalloides*, *Agaricus stercoracius*, *Boletus satana*, ecc. Ma più frequenti secondo il Weiss sono gli avvelenamenti per funghi putrefatti, i cui sintomi sono analoghi ai sintomi per avvelenamenti da salsicce, carne, ecc. provenienti dalle decomposizioni degli albuminoidi. Essi darebbero neurocolidina, metilamina.

Dall'esposizione precedente appare chiaro che malgrado i progressi fatti sulla conoscenza dei processi della putrefazione, molto ancora resta

a sapere. Nè si può essere sicuri sulla stabilità dei prodotti singoli, non ancora tutti noti nella quantità e qualità, legati poi a condizioni mutevoli di temperatura e mezzi. Nè si sa bene, se accadono modificazioni speciali nei diversi metodi di preparazione delle singole sostanze (Ehrenberg).

Tutte le ricerche tra le diverse discrepanze armonizzano bene in questo, che la flora batterica partecipante alla putrefazione è varia; alcune specie sono assai più costanti quali il *B. proteus*, il *B. putrificus*, il B. di Gaertner e i paratifi; ma nè tutte, nè specialmente tutte queste sempre vi pigliano parte.

Ora dalle diverse associazioni microbiche nelle singole e diverse simbiosi i prodotti singoli non ponno essere costanti. E' così che la colina ottenuta da Ehrenberg, dal B. di Nauwerk, non era tossica. E i prodotti della cultura di *B. coli* ottenuta in un caso di avvelenamento per carne da Holst Peter resistevano alla temperatura di 100°, come le tossine del *B. enteritidis*. D'altra parte il *Proteus* è scarsamente patogeno e mezzanamente tossico; le sue tossine non resistono a 100°; il *B. putrificus coli* di Bienstock non è tossico, nè patogeno; il B. di Gaertner è fortemente patogeno ed è fortemente tossico; ma non esiste sempre nelle sostanze in putrefazione; e i prodotti della putrefazione come taluno dimostrò (Roger), come Cassedebat rilevò dall'infuso delle scatole di carne da lui esaminate e noi possiamo riaffermare, resistono lungamente a 100°.

D'altra parte non può ancora dirsi interamente nota la flora batterica delle sostanze organiche in putrefazione. E' assai frequente che nuovi ricercatori segnalino nuove specie patogene e tossiche.

Anche il Lombardo dal materiale nostro di esame ha isolato nell'Istituto molti anerobii e tra questi alcuni patogeni.

E' pertanto convinzione e conoscenza acquisita che l'attività dei microbi nei terreni di cultura non è solamente e sempre secretiva ma imprime modificazioni al *substrato nutritivo*.

Si sa che le ptomaine pigliano origine dalle sostanze albuminoidee e sostanze ricche di corpi proteici favoriscono le toxine, le quali ponno considerarsi quali prodotti intermedii delle ossidazioni o delle disintegrazioni e che il processo della putrefazione sia favorito proporzionalmente al contenuto delle sostanze azotate delle materie organiche in putrefazione (Kostiurine e Krainski). Fu perciò ripetuto che i funghi contenendo un tasso alto di sostanze quaternarie, come sostanze che sono più affini alla carne, dovrebbero dare processi più attivi di putrefazione e prodotti più tossici, donde la maggiore frequenza di casi di avvelenamento, a prescindere dalla proprietà più particolare delle sin-

gole specie vegetali e relativi veleni. Tuttavia un dato comparativo dei prodotti dei diversi sostrati alimentari col loro indice di tossicità totale pei diversi terreni non fu ottenuto, per quanto io sappia.

E dei diversi germi riscontrati nella putrefazione, se singolarmente fu studiato e ottenuto il potere immunizzante come pel *Proteus*, l'edema maligno, il botulismo, per altri il risultato fu negativo singolarmente, e per l'insieme dei prodotti, la cui azione è diversa, nulla si sa. E' noto però che i prodotti della putrefazione ponno arrestare il processo dell'edema maligno, se inoculati asetticamente sotto cute e le culture dell'edema maligno commiste ai prodotti della putrefazione perdono completamente le loro proprietà tossiche.

Tenuto conto di tutto ciò ho voluto ricercare quale era l'azione in toto dei prodotti della putrefazione di diverse sostanze alimentari, stabilire un certo indice relativo di tossicità, e se tali prodotti hanno potere d'immunizzare.

II.

Metodo d'indagine per stabilire l'indice di tossicità tra le diverse sostanze alimentari in putrefazione.

Innanzi tutto fu fatta una lista delle principali sostanze alimentari vegetali ed animali.

Per le sostanze animali furono prescelte quelle dei bovini, ovini, suini, del pollo, della tartaruga, del merluzzo, del polpo, dell'aragosta, dell'ostrica, del *mytilus* Da esse furono prescelte le carni e, dove si potette, i diversi organi.

Tra questi il cervello, il fegato, la milza, il pancreas, i reni, le glandole linfatiche, i testicoli, i muscoli.

Come tessuti liquidi o liquidi di provenienza animale fu esaminato il grasso, il sangue, il latte, il brodo, il peptone, l'albume ed il tuorlo d'uovo, i formaggi.

Tra i generi alimentari di origine vegetale furono prescelti allo stato secco il grano, l'orzo, il mais, il riso, l'avena, i piselli, le lenticchie, i fagiuoli, le farine, le paste, il caffè, lo zucchero; quindi allo stato fresco, i funghi, le patate, i piselli, le fave, i fagiuolini.

Della più parte di queste diverse sostanze furono fatti saggi preliminari per fissare quale mezzo era più rispondente ad ottenere una stessa norma per renderli a pari condizioni putrescibili e fosse più facile esaminarne comparativamente il potere tossico.

Quindi fu prescelto l' infuso nella proporzione in peso di una parte di sostanza e due di acqua. Proporzioni più ristrette, come di una parte di sostanza ed una parte di acqua, davano per certi gruppi di sostanze liquidi poco filtrabili e quelle in proporzioni maggiori con una parte di so-

stanza e cinque di acqua davano talvolta per certi altri gruppi liquidi assai poco tossici. Per diverse sostanze furono fatte successivamente serie a soluzioni diverse, per fissare meglio il rapporto delle diverse soluzioni nei loro effetti. Le sostanze erano tagliate a piccoli pezzi e mescolate all' acqua (tolta da uno stesso serbatoio) in un matraccio chiuso con sughero e sigillato con cera lacca.

Tutti i saggi furono esaminati dapprima a temperatura ordinaria, tenendo conto della temperatura massima e minima giornaliera. Tali saggi furono fatti principalmente nelle stagioni invernali. Di poi per le sostanze più tossiche furono fatte serie d'infusi a temperatura costante di 37°. Oltre la serie d'infusi conservati in matracci chiusi con sughero e cera-lacca furono conservati saggi di sostanze in tubi di vetro chiusi alla lampada in condizioni anerobiche perfette, così alla temperatura ordinaria, come alla temperatura costante di 37°. Il termine di tempo prescelto, come termine comune di putrefazione per tutta la serie, fu il periodo di 7 giorni. Gruppi speciali di sostanze furono poi esaminati a tre, cinque, sette, dieci, quindici, trenta giorni, diversi mesi, un anno e più.

Tutti gl'infusi furono filtrati a traverso filtro di carta bibula; saggiata la reazione, tenuto conto dell'odore e colore, il filtrato veniva inoculato negli animali di esperimento.

Fu prescelto di filtrare gli infusi a traverso la carta bibula per procedere più speditamente nella ricerca ed avere un termine fisso e facile di paragone per le diverse sostanze. Il filtro Chamberland non fu adoperato perchè talvolta riteneva, per prove ottenute, una certa quantità di sostanze tossiche, nè era facile e possibile sempre filtrare per esso grandi quantità di sostanze, di cui talune ricche di sostanze colloidi e di sostanze albuminoidee non facilmente filtrabili.

Tuttavia per taluni infusi più tossici si esperimentò anche il filtrato del filtro Chamberland e la loro azione dopo il riscaldamento a 60°, dopo la ebollizione, la riduzione di volume alla pompa di Weber, all' azione della luce, all'azione del tempo, all'azione della soluzione di Lugol.

La via di inoculazione prescelta generalmente fu l' endovenosa a traverso la giugulare. Per singole sostanze si esperimentò la via ipodermica, l'endoperitoneale, la subaracnoidale, la via interna orale, rettale, la tracheale.

Il liquido filtrato era versato in una buretta graduata e per mezzo di un ago-cannula veniva lentissimamente inoculato nella giugulare debitamente scoperta ed isolata. E' inutile dire che si usava ogni precauzione per evitare possibili errori.

L'iniezione era regolata a mezzo di una pinza a pressione di Moor. Verificandosi i primi fenomeni si soprassedeva per continuare l'inoculazione sempre lentamente. Essa si sospendeva alla cessazione della respirazione e successivamente alla morte dell'animale.

Letta sulla buretta la quantità di liquido inoculato si segnava e rapportava al per mille di peso, stabilendo così la norma fissa pel paragone delle diverse sostanze, i cui due termini fissi erano rappresentati dalla morte dell'animale ed il per mille necessario ad ottenerla.

L'animale di esperimento prescelto per tutta la serie delle diverse sostanze animali e vegetali fu il coniglio. Per infusi di singoli gruppi di sostanze furono ancora esperimentati le cavie, il pollo, il gatto, il cane.

III.

Azione tossica.

Filtrati d'infuso estremamente tossici iniettati in vene diedero la morte rapidamente alla dose minima mortale in coniglio di 0.8, in cavia di 0.5.

Altri filtrati pochissimo tossici non dettero la morte nemmeno se inoculati all'altissima dose di cc. 238 °/₀₀.

Nell' un caso e nell'altro il quadro sintomatico presentato dagli animali poteva dirsi grandemente analogo, se non identico e la differenza maggiore risultava più che specialmente dal quadro morboso, dalla rapidità con cui i sintomi si svolgevano, dal loro esito.

I sintomi che manifestavansi immediatamente all'osservazione si svolgevano del tutto nella sfera d'azione del sistema nervoso e del respiro.

Il *tipo*, la *frequenza*, il *ritmo respiratorio* erano peculiarmente affetti e prima di ogni altro sintomo tali alterazioni aprivano la scena dei disturbi. Il respiro diventava frequente, superficiale, rapido, poi si allentava e ripigliava una media di regolarità, o ritornava frequente, poi raro, superficialissimo, con vere fasi di apnea, assumendo il classico quadro della respirazione di Cheyne-Stokes. Se il filtrato non era grandemente tossico o la quantità inoculata non raggiungeva la minima mortale, le fasi di respiro ripigliavano il ritmo e la frequenza normale, spesso lentissimamente, altre volte più facilmente.

Ma allorquando così non era, le fasi di apnea si succedevano con frequenza notevole, il respiro diventava superficialissimo, e questo sovente si arrestava per diversi secondi, insino a qualche minuto, facendo pensare alla morte dell'animale, se non si fosse ricorso all'apertura del torace e non si fosse così controllato lo stato del cuore. Altre volte il respiro, malgrado le fasi di apnea enormemente prolungate (sì che si poteva credere alla morte dell'animale), si ripristinava e l'animale sopravviveva.

Accanto a questa forma classica di alterata respirazione, si avevano talora fasi succedentisi di inspirazioni profonde, accompagnate da un grido stridente acutissimo, come negli attacchi epilettici, e cianosi e respiro stertoroso, il cui esito poteva essere ancora la risoluzione completa e il ritorno lento allo stato normale.

Nel *campo del sistema nervoso*, appena dopo le prime modificazioni del respiro o diverso tempo dopo, quasi mai contemporaneamente (e secondo la diversa tossicità del filtrato esaminato) apparivano contrazioni dei muscoli del corpo e prima di tutto degli arti. Soventi nelle forme d'intossicazione lenta le prime contratture colpivano singoli arti di una stessa zampa o di zampe similari.

Tali contrazioni avevano caratteri del tutto analoghi alle contrazioni ordinarie volitive dell'animale e se ne differenziavano solo per la grande dissociazione del movimento; questo essendo fatto peculiarmente da un solo singolo artiglio, senza compartecipazione di flessione ed estensione consensuale degli altri artigli della stessa zampa. Dapprima rare, tali contrazioni divenivano più frequenti, colpivano diversi artigli e si diffondevano ad altri gruppi muscolari più complessi, ora con movimenti associativi funzionali, più spesso con movimenti definiti di contrazioni, flessorie ed estensorie o di supinazione, ecc., assumendo gradatamente o rapidamente i caratteri fondamentali della contrattura classica, rapide nelle contrazioni, rapide nelle risoluzioni, contradittorie nelle finalità. Quindi le scosse divenivano generalizzate al capo, agli arti, a tutto il tronco. E colla generalizzazione delle contratture monoplegiche, paraplegiche (raramente emiplegiche) i caratteri di esse mutavano e da cloniche divenivano toniche. Tutti i muscoli dell'animale erano presi, nessuno eccettuato: la colonna vertebrale si tendeva inarcandosi, il prelo addominale si contraeva, il collo s'irrigidiva, uno stato tetaniforme colpiva tutto il corpo e le membra restavano in tale fase diversamente, infino a che l'attacco convulsivo epilettico cedeva alla completa risoluzione.

Durante l'attacco i riflessi congiuntivo-palpebrali erano aboliti, erano aboliti i riflessi pupillari e le pupille erano rigide in stato di miosi e talvolta di midriasi.

Colla risoluzione completa i riflessi congiuntivo-palpebrali e pupillari ritornavano e ricompariva il ritmo respiratorio arrestato in fase d'inspirazione forzata.

Gli accessi sovente si ripetevano una o due volte.

Talvolta colle sostanze molto tossiche la morte accadeva già dopo il primo accesso.

Negli intervalli tra i singoli accessi continuavano piccole scosse isolate dei muscoli, degli arti, della faccia, del laringe, della bocca, dell'occhio. L'occhio diventava fisso con strabismo e nistagmo. Esisteva blefarospasmo, talvolta con midriasi, più spesso con miosi. La persistente perdita dei riflessi oculo-palpebrali era il segno della prossima morte, la quale accadeva sotto l'influenza di nuove scosse tonico-clonico-generalizzate con nuovi e reiterati movimenti dei muscoli della bocca e del laringe, con perdita delle feci e delle urine.

Nei casi in cui la tossicità del liquido non era molto alta, i fenomeni, sempre gli stessi, si svolgevano più lentamente, talvolta si aveva prevalenza dei fenomeni respiratori su tutti gli altri, tale altra volta questi restavano soverchiati dai fenomeni convulsivi, ma ciò senza costanza definita per l'infuso di una sostanza, più che di un'altra, lo stesso infuso provocando prevalenze diverse nei diversi animali della stessa specie e dello stesso peso.

Nei casi di sostanze non molto tossiche od in cui la quantità inoculata era al disotto della minima mortale, l'animale presentava o no fenomeni convulsivi durante l'inoculazione, si levava dal tavolo di esperimento generalmente coi sintomi di una grave astenia.

L'astenia talora colpiva tutti i quattro arti, altre volte soltanto il treno posteriore, alle volte solo il treno anteriore.

L'astenia talvolta era così notevole da dar luogo ad una vera forma di paralisi-paraplegica, più spesso; più raramente monoplegica, rarissimamente emiplegica.

Appena dopo la risoluzione muscolare o contemporaneamente ad essa cessava la respirazione, mentre il cuore continuava a battere lungo tempo dopo, a volte diversi minuti primi ed all'apertura del torace si poteva constatare che le contrazioni divenivano prima più rare, più lente, poi vermicolari. E di queste, prime a cessare erano quelle del ventricolo sinistro, poi quelle del ventricolo destro, infine quelle dei seni.

Ma i fatti nervosi a volte in un primo tempo si dileguavano (più o meno lentamente), altre volte si aggravavano progressivamente, ciò che accadeva più spesso, ed all'astenia o paralisi si associavano le contratture clonico-toniche già descritte innanzi che si seguivano a grandi intervalli. Soventi esse si provocavano al più lieve sollevamento, al pizzicore della cute, al più lieve tocco.

Con i fenomeni convulsivi apparivano i disturbi oculari, le miosi, la midriasi, la perdita dei riflessi, e questa persistendo costituiva sempre il segno premonitore della morte, la quale accadeva dopo diversi giorni ed ore sotto l'influenza dei soliti attacchi tetaniformi e sempre l'animale si ritrovava disteso e irrigidito nella più grande iperestensione, col più forte opistotono.

Uno dei sintomi che si produceva soventi e talora in maniera sorprendente era l'esoftalmo. La protrusione del bulbo oculare dava luogo ad una delle forme più classiche di questo fenomeno. Sempre l'esoftalmo era bilaterale, a volte succedeva al blefaro-spasmo. Era naturalmente dovuto a paresi dell'orbicolare delle palpebre; restava invariato insino alla morte e persisteva anche dopo.

Nelle forme d'intossicazioni croniche provocate mercè inoculazioni di filtrato tossico a dosi crescenti, i fenomeni che si presentavano non erano sempre quelli classici delle forme acute, poi che dosi frazionate di filtrato erano tollerate benissimo lungamente, senza alcun disturbo apparente del sistema nervoso e nondimeno davano adito ad alterazioni parenchimali del rene.

Un coniglio a cui nel periodo di un mese furono inoculati intercalatamente sotto cute 60 cc. di filtrato tossico nella misura, di 4. 1 ‰ senza dare segno di alcun disturbo nervoso apparente, all'autopsia presentava ingrandimento del fegato e nulla di apparente negli altri organi; e mentre all'esame istologico del rene non si potette rilevare alcuna traccia di degenerazione grassa (fissazione al Flemming, colorazione alla saffranina) si riscontrarono le note di una nefrite parenchimale: rigonfiamento torbido dell'epitelio dei tubuli retti, degenerazione granulosa dell'epitelio delle anse di Henle e tubuli contorti, distensione delle capsule di Bowmann. Nel fegato si riscontrò notevole pigmentazione, senza evidente interessamento degli elementi cellulari. *Nel sistema nervoso si riscontrò notevole iperemia delle meningi; distensione dei capillari e degli spazi linfatici perivasali; spezzettamento dei prolungamenti protoplasmatici; scomparsa frequente dei corpuscoli di Niessl; disintegrazione granulosa del protoplasma; aumento degli spazi pericellulari* (Metodo di Niessl, fissazione alla formalina 10 %). Queste alterazioni colpivano sopratutto gli *elementi motori* delle

corna anteriori del midollo spinale, e più ancora gli elementi cellulari dei nuclei *del midollo allungato* e le grandi cellule *piramidali della corteccia*. L'animale era morto per dissanguamento. Non vi era stata alcuna traccia d'infezione.

Lesioni simili erano state riscontrate altre volte in altri animali intossicati lentamente. Nei casi in cui furono praticate inoculazioni tracheali, o accidentalmente filtrato tossico era penetrato nelle vie aeree, i pulmoni presentavano tutte le note di una gangrena pulmonare svoltasi rapidamente nel periodo di pochi giorni.

Le lesioni più minute dei singoli organi saranno più diffusamente riferite a parte. Pel momento basta all' indole di questo lavoro avere accennato alle alterazioni più notevoli ritrovate, e sopratutto quelle istologiche del sistema nervoso sinora mai descritte od accennate. Quelle del fegato e del rene già furono rilevate dal Frisco.

Soffermatici alla forma clinica, accennati i fatti delle forme croniche e alterazioni anatomiche, ritorniamo ai risultati ottenuti per la serie dei diversi infusi delle varie sostanze, che, come di già fu detto, non furono diversi per la forma morbosa, nè costantemente ed uniformemente diversi da potere nettamente sceverare singoli quadri morbosi pei diversi infusi e filtrati, sicchè veramente una stessa forma morbosa risultò analoga, se non quasi identica, per gl'infusi delle più diverse sostanze.

Una sola differenza poteva determinarsi, e ciò poteva accadere soltanto per l'intensità dei fenomeni, ora maggiore e più complessa, ora minore e più dissociata.

E se una duplice categoria sarebbe parso potersi verificare per le due grandi categorie di sostanze, cioè le sostanze animali e le sostanze vegetali, neppure per queste la differenza tra i due grandi gruppi fu uniforme e costante. E per volere con maggiore chiarezza venire esponendo i multiformi risultati ottenuti, è opportuno riferirli a gruppi per meglio vagliare le differenze e le analogie.

Per l'esame generale di tutte le serie in generale ci servimmo d'infusi di sostanze alla diluzione in peso 1 a 3, a temperatura ordinaria, dopo il tempo di 7 giorni, filtrati a carta bibula svedese, per inoculazione in giugulare di conigli, valutato l'effettivo al per mille di peso.

Da un esame generale risultò che in media la *tossicità degli infusi di sostanze animali non fu sempre superiore alla tossicità d'infuso di qualunque sostanza vegetale. Di più che la tossicità più bassa d'infuso* (pei saggi di esperimenti scelti), *non si ebbe tra le sostanze di natura vegetale, bensì tra gl'infusi di sostanze di natura animale.* Così il latte di capra non fu tossico mortale alla dose minima di 238 cc. ‰, l'albume di uovo lo fu alla dose di 113 cc. ‰, il sangue di pollo a

140 cc. ‰, le vongole ad 87.1, le ostriche a 60 cc. ‰. Si ottenne la morte col cervello di manzo a 53.6 ‰, col testicolo a 118 ‰, col torlo d'uovo a 78.

Fra le sostanze vegetali le cifre più basse furono date dal cavolo fiore 123.9 ‰, dall'orzo 115 ‰, dalle fave fresche 75 ‰.

Viceversa sicuramente la tossicità più alta fu data dagli infusi di sostanza animale e sopratutto dagli infusi dei visceri emopoietici degli animali, quali la milza e sopra tutti il fegato.

Dagli esami in serie dei visceri e tessuti di uno stesso animale la differenza di tossicità fu massima tra il testicolo (118) e il fegato (4.8). Dopo il fegato vennero quindi la milza (6.2), il timo (8.2), i muscoli (11), il rene (15 cc.), le glandole linfatiche (39.3), il grasso (46.6), il cervello (53.6), il sangue di pollo (140).

Qui diamo la tabella riassuntiva in media di cinque esami in serie di tessuti e visceri di manzo colle solite condizioni di sopra indicate.

Animale di scelta, manzo:

Organi e tessuti		
Fegato	cc.	4.8
Milza	»	6.2
Timo	»	8.2
Muscoli	»	12.2
Tiroide	»	25.0
Pancreas	»	35.0
Glandole linfatiche	»	37.0
Grasso	»	46.6
Sangue	»	50.0
Cervello	»	53.6
Testicolo	»	118.0

Queste differenze nei risultati tra i singoli organi e tessuti di uno stesso animale furono presso a poco le stesse pei saggi fatti per il maiale, per la capra e il pollo.

Qui si riportano i risultati in tabelle comparative.

	Maiale	Pollo
Fegato	6.9	7.3
Milza	10.0	—
Muscoli	11.0	59.9
Reni	15.5	—
Cervello	53.6	—
Sangue	34.9	140.0

E le stesse differenze tra i vari organi e tessuti si ebbero per le capre, benchè in questo caso gl'infusi fossero stati tenuti a temperatura di 37°.

	Capra	Pollo
Fegato	6.8	2.0
Milza	5.6	—
Muscoli	8.7	25.0
Reni	9.0	—

Le stesse differenze tra muscoli e fegati furono ritrovate nei pesci, nelle tartarughe. Quivi i saggi furono ottenuti alla temperatura di 37°.

	Muscolo	Fegato
Merluzzo	34.3	4.3
Dentice	37.0	5.0
Tartaruga	10.8	2.8
Rana	—	—

Se si riassumono in una tabella da un canto tutti i risultati ottenuti per le carni dei differenti animali, e quelli ottenuti per il fegato, si ha una relativa uniformità approssimativa, assai sorprendente per gli infusi di fegato ed una varietà differenziale straordinaria per gli infusi di muscoli.

Qui riportiamo le tabelle riassuntive di questi diversi esperimenti a temperatura costante di 37° nelle proporzioni di 1 : 1 per 7 giorni.

	Muscolo	Fegato
Manzo	9.0	2.8
Capra	8.7	5.6
Maiale	11.0	6.9
Pollo	25.0	2.0
Merluzzo	34.0	4.3
Dentice	37.0	5.0
Tartaruga	10.8	2.8
Rana	4.5	—

Dalla tabella risulta tra le carni muscolari una grande sproporzione di una tossicità oscillante fra una massima di 25 cc. per le carni di pollo ed una tossicità minima pel muscolo di maiale e manzo, in media intorno a 10 cc.

Viceversa per gli infusi di fegato la tossicità oscilla intorno a 2.8 cc. e minimo a 6.9-7. Si vedrà in prosieguo come una tale maggiore tossicità per gli infusi di fegato si sia mantenuta costantemente oltre che per tutta la serie animale tolta in esame per le diverse modalità di preparazioni degli infusi, con modificata temperatura, modificate proporzioni di equivalenza, di varia durata, ecc.

Quanto poi *alle carni dei crostacei* e *molluschi* si ébbero anche in queste categorie differenze notevolissime oscillanti tra un massimo di 87.1 per l'infuso di vongole e 16.1 per i *Mytilus*.

La massima tossicità fu data dalla aragosta, sia pei suoi visceri, che per le sue carni, come apparisce dalla tabella riassuntiva dei diversi saggi

praticati. In questa la tossicità era pari a quella delle carni e organi di manzo.

Aragosta.......... visceri 9.3 cc......carni	10.3
Mytilus	16.1
Polpo	24.5
Seppia	29.8
Ostriche, non produsse *morte*	60.2
Vongole, non produsse *morte* immediata	87.1

Ora quando si pensa ai notevoli disturbi gastro-enterici prodotti dalla ingestione di ostriche e *Mytilus*, è molto significante rilevare come il loro potere tossico in putrefazione sia di molto inferiore a quello delle altre specie di alimenti.

Qui si riporta il risultato della *tossicità di altre sostanze di origine animale*, quale:

Albume di uovo	113.0
Torlo di uovo	78.0
Peptone 1%	133.0
Brodo con peptone 1%	34.7
Latte di capra	238.0 (1)
Formaggi:	
gorgonzola	3.8
svizzero	10.3
parmigiano	10.0

Così qui si rileva la maggiore tossicità dei formaggi, specie il gorgonzola, la minima tossicità dello albume di uovo e del latte, la discreta tossicità del torlo d'uovo, tra un massimo di 3.8 (gorgonzola) e un minimo di 238 (latte).

Infine i *risultati dei diversi saggi dei vegetali* furono i seguenti:

Piselli secchi	8.8
Piselli freschi	14.8
Fave secche	10.4
Fave fresche	75.0
Farina di mais	11.8
Broccoli	22.2
Lenticchie secche	28.0
Patate	29.6
Pasta	45.0
Funghi	78.3
Cavolifiori	128.3
Glucosio 5 %	180.6
Orzo	115.0
Riso	100.0
Caffè	20.0
Terreno dell'ospedale	147.3

(1) Non ha dato la morte all'animale.

Le cifre innanzi riportate sono state tolte per i saggi, in cui la tossicità era minima da uno a cinque saggi, per quelli, in cui la tossicità era massima da molte prove e ripetuti saggi.

Le diverse riprove, non necessarie per gl'infusi a debole potenziale, perchè l'indice di tossicità era presso che costante, erano indispensabili per quelli ad alta tossicità, poichè variavano sovente da l'uno all'altro saggio e sovente negli animali della stessa specie, anche per uno stesso saggio.

Nè tali variazioni erano da riferirsi sempre alla grandezza dello animale, poichè sovente, a parte il rapporto circa la percentuale di peso, la tossicità era inversamente proporzionale al peso dell'animale stesso, sì che animali di peso minore presentavano una tossicità più bassa di animali di peso maggiore.

Ecco una serie di prove fatte a tale intento:
Infuso di fegato di tossicità nota 4.5 %, inoculazione in giugulare.

Coniglio	peso	gm. 1250,	dose	mortale	5.0	= 4.0 ‰
Id.	id.	» 780,	id.	id.	4.2	= 5.3 ‰
Id.	id.	» 1000,	id.	id.	4.7	= 4.7 ‰
Id.	id.	» 600,	id.	id.	3.1	= 5.1 %

Tali prove dimostrano chiaramente come la maggiore o minore sensibilità alle tossicità dei prodotti animali putridi sia da cercarsi in tali casi non tanto nelle dimensioni dell'animale, quanto nella variabilità di altre condizioni di resistenza organica e dei poteri reattivi dell'organismo, naturali o acquisiti.

Oltre ciò, a parte talune differenze risultate alle prove, tra diverse altre, di una stessa sostanza, quantunque nell'insieme erano di poco più che di 1 a 3 o 5 cc. di liquido e la media delle diverse riprove rappresentasse il termine giusto intorno a cui si aggirava la tossicità normale di un infuso di una data sostanza, pure talvolta accaddero differenze notevoli per contingenze non rilevabili, nè imputabili ad errori. Tra i saggi d'infuso di fegato di manzo al numero di 50 e più, i quali in media dettero sempre una tossicità oscillante tra 2 e 6 (per infusi a temperatura costante di 37°), una volta senza variazioni per durata di tempo, per equivalenza di diluzione, per differenza di temperatura, la tossicità si tenne bassa nei limiti di 20.1 ‰, la quale tossicità fu costante in tale cifra per 5 successive riprove su 5 conigli dello stesso peso circa e costante in rapporto al mille di peso.

Fissate le medie generali di tossicità per gli infusi di scelta, a studiare l'*influenza di temperatura sulla loro tossicità* vennero prescelte appunto le sostanze più tossiche quali il fegato, la milza, il gorgonzola, e le sostanze meno tossiche, quali il cervello, il latte, il cavolofiore.

Di queste sostanze si fecero una duplice serie. Nella prima serie dopo 7 giorni a temperatura ordinaria, saggiate le tossicità relative, gli infusi pas-

sarono nella stufa a temperatura costante di 37°, ove si tennero altri 7 giorni. Nella seconda serie si tolsero le sostanze, si fece di ognuna una coppia di saggi a condizioni pari di diluzione e di tempo, lasciando uno a temperatura ordinaria, uno a temperatura costante di 37°.

E' opportuno riportare qui i risultati ottenuti.

I serie:

Fegato,	7 giorni a temp. ordin.		6.8,	7 giorni a temp. 37°,		4.6	
Milza,	id.	id.	8.1,	id.	id.	5.2	
Gorgonzola,	id.	id.	6.5,	id.	id.	3.0	
Cervello,	id.	id.	84.3,	id.	id.	38.1	
Latte,	id.	id.	238.0, (*)	id.	id.	200.0	(*)
Cavolofiore,	id.	id.	123.9,	id.	id.	36.0	

(*) Non ha dato la morte.

II serie:

Fegato,	7 giorni a temp. ordin.		6.5,	7 giorni a temp. 37°,		3.6	
Milza,	id.	id.	8.2,	id.	id.	4.0	
Gorgonzola,	id.	id.	7.0,	id.	id.	3.2	
Cervello,	id.	id.	70.0,	id.	id.	31.0	
Grasso,	id.	id.	46.6,	id.	id.	28.3	
Latte,	id.	id.	215 (*)	id.	id.	220.0	(*)
Cavolofiore,	id.	id.	130.0	id.	id.	32.0	

(*) Non dette la morte.

L'influenza favorevole della temperatura sulla maggiore tossicità dei saggi tolti in esperimento non potrebbe essere maggiore. La disproporzione apparisce sopratutto nelle sostanze meno tossiche, ove è possibile discendere ad un minimo di tossicità non prevedibile. Ed anche colle sostanze rispondenti ad un tasso molto alto di tossicità, questa è aumentata straordinariamente, sicchè si può dire che sicuramente la temperatura costante di 37° rapportò circa al doppio il grado di tossicità degli infusi relativi.

L'influenza del grado di diluizione degli infusi in rapporto al grado di tossicità dei prodotti putridi fu saggiata variamente a temperatura ordinaria e a temperatura costante di 37°. A tale uopo tra le diverse sostanze furono prescelte le sostanze più tossiche per potere cogliere le differenze nelle diluzioni minime.

Furono perciò fatte le serie col fegato di manzo in diluzioni di 1 %, di 2 %, di 10 %, di 20 %, di 50 %, di 100 %. Queste diluzioni furono tenute a temperatura ordinaria. I risultati quali rilevansi dalla tabella dimostrano che si ebbero differenze notevolissime tra l'1 % e il 2 %. Notevoli molto anche tra quelle di 2 e 10. Nessuna tra quelle di 10 e 20, appena tra queste e quelle di 50. Sensibili tra quelle di 50 % e 100 %.

TABELLA. — **Fegato di manzo:**

5 : 500 = 1 : 100 T. O. per 6 mesi.
59 °/₀₀ non uccidono coniglio, non dà segno di alcuna contrazione.
Sospesa inoculazione per incidente operativo, l'animale si mostra paretico, ma non offre alcun fatto rilevante e continua a star bene nei giorni successivi.

10 : 500 = 2 : 100 T. O. per 6 mesi.
48.4 cc. °/₀₀ uccidono l'animale nella forma classica consueta. Il cuore ha cessato di battere; ma lungamente dopo la morte apparente si hanno contrazioni fibrillari.

50 : 500 = 10 : 100 T. O. per sei mesi.
cc. 14.2 °/₀₀ uccidono coniglio con solita forma,
cc. 15.1 °/₀₀ uccidono coniglio con solita forma.

100 : 500 = 20 : 100 T. O. per 6 mesi.
14 cc. uccidono coniglio.

300 : 600 = 50 : 100 tossicità 11 °/₀₀.

500 : 500 = 100 : 100 tossicità 8 °/₀₀.

Nell'altra serie di diverse diluzioni a temperature di 37° così pel fegato di manzo, come pel fegato di maiale nelle proporzioni di 30 % e del 100 % si ebbero analoghe differenze che per la temperatura ordinaria ed in maniera abbastanza costante e sensibile.

Riportiamo al riguardo uno stralcio di una serie di saggio coi relativi risultati.

Qui apparisce ancora manifestamente, come la maggiore concentrazione produce prodotti putridi di maggiore tossicità.

Fegato di maiale.	*Fegato di manzo.*
200 : 600 T. 37° 10 giorni.	200 : 600 T. 37° 10 giorni.
Conservato per 14 mesi.	Conservato per 14 mesi.
Coniglio di 1005 grammi.	Coniglio 965 grammi.
Morto con 7.9 cc. °/₀₀ solita forma.	Ucciso con 7.4 cc.
	Tossicità pari a 7.5 °/₀₀.

Fegato di maiale.	*Fegato di manzo.*
300 : 300 T. 37° 10 giorni.	300 : 300 T. 37° 10 giorni.
Conservato per 14 mesi.	Conservato per 14 mesi.
Coniglio di 1055 grammi è ucciso con 5.1 pari 4.6 °/₀₀ di tossicità.	Coniglio del peso di 590 grammi.
	Muore con 2.7 cc.
	Tossicità pari a 4.4.

Per ricercare l'influenza del tempo sul grado di tossicità dei prodotti putridi alimentari ci siamo serviti di quasi tutta la serie degli infusi conservata per 10-14-18 mesi. Gli infusi furono conservati la più parte a temperatura ordinaria dal principio, altri furono conservati a tem-

peratura di 37° costante per 7 giorni e quindi conservati a temperatura ordinaria.

La poca influenza del tempo sulla tossicità di tali prodotti apparisce quando si sarà detto che infusi di fegato nella diluzione di 30 % presentavano, dopo 6 mesi, la tossicità di 9 °/₀₀ e che infusi conservati dapprima alla temperatura di 37 e poi alla temperatura ordinaria avevano tossicità di 7 e quelli nella concentrazione di 1 : 1 davano ancora, dopo 14 mesi, la tossicità media di 4. 2.

Il modo di conservazione degli infusi alimentari circa la loro chiusura non è del tutto indifferente al risultato finale dell'indice di tossicità in rapporto al tempo, nè in rapporto a sè.

I matracci che furono conservati per lungo tempo nella maniera più assoluta chiusi all'aria, conservarono al tempo stesso un indice di tossicità immutato o quasi; qualche oscillazione in meno e sensibile la presentarono quelli infusi che non erano troppo bene chiusi. Ad esempio un infuso di fegato di maiale di tossicità iniziale 6.9 °/₀₀ dopo 14 mesi dette 14.6 in media. La morte apparente dell'animale si ebbe ad 11.1. Mentre altri infusi di fegato, come abbiamo visto, la conservarono inalterata a 4.2, 4.6. E tale oscillazione si verificava piuttosto al primo tempo dopo la prima settimana e nelle altre due prossimiori, al di là delle quali la tossicità restava immutata.

La riprova dell'influenza di conservazione circa le condizioni aerobiche od anerobiche ci fu fornita dai saggi di gorgonzola e fegato conservati in tubi chiusi alla lampada e in recipienti aperti a temperatura ordinaria e a temperatura costante.

Ecco i risultati:

Fegato ad	infuso aerobio	T. O.	tossicità	cc. 2.4 °/₀₀ —	anerobio	cc.	2.1 °/₀₀
	Id.	T. 37°	id.	cc. 5.5	id.	cc.	3.7
Gorgonzola	id.	T. O.	id.	cc. 7.2	id.	cc.	3.8

Da essi si rileva ancora pei primi quattro saggi relativi al fegato che la tossicità nei primi due fu più alta che negli altri due, quantunque il fegato fosse stato lo stesso e della stessa provenienza fosse stata l'acqua di diluzione.

L'eccezione è pel fatto che i saggi a temperatura ordinaria hanno dimostrato una tossicità maggiore a quelli conservati a temperatura di 37° ciò che è opposto alla regola.

Infine giova riferire qui ancora la varietà di risultati ottenuti per gli infusi di sostanze previamente bollite e poi mescolate a nuova acqua di fonte nel rapporto maggiormente favorevole di tossicità cioè quello di 1 a 1. Da tali risultati apparisce quanto la tossicità degli infusi di sostanze bollite fosse più bassa che la tossicità ordinaria.

A tale uopo furono scelte quali sostanze di prova il fegato e la milza di manzo, il fegato e la milza di maiale e di capra. Di ognuna di queste

sostanze fu fatto un doppio saggio, ciascuno conservato in matraccio separato. Di ciascun tipo una parte fu bollita per cinque minuti, indi separata l'acqua che aveva bollito, fu aggiunta nuova acqua, dalla stessa fonte chè per gli altri saggi di sostanze non bollite. Tutti i saggi furono portati nella stufa a 37° e quivi tenuti per 15 giorni. Indi furono saggiati come al solito dopo filtrazione per carta bibula, inoculati in giugulare di conigli e riferiti al 1 °/₀₀.

Queste furono le cifre ottenute pel manzo e il maiale.

Manzo:

Fegato comune a T. 37°	media di 5 prove	cc.	2.8 °/₀₀
Fegato bollito	id.	id.	22.8
Milza comune	id.	id.	6.2
Milza bollita	id.	id.	30.6

Maiale:

Fegato naturale	T. 37°	per 10 giorni media 5	tossicità	6.9 °/₀₀
Fegato bollito	id.	id.	id.	20.4
Milza naturale	id.	id.	id.	10.2
Milza bollita	id.	id.	id.	39.3

I risultati ottenuti per le diverse vie di inoculazione è bene riportarli nei reperti segnati pei più salienti e diversi esperimenti.

Si procedette dal fissare la dose minima mortale per l'inoculazione in giugulare e rilevare il quadro morboso sia con la dose mortale, sia con dose non mortale, ma visibilmente tossica.

Si cercò quindi di fissare la dose minima mortale per le altre vie di inoculazione, quale la peritoneale, la subaracnoidale, l'ipodermica, l'orale, la rettale, la tracheale. Si tentò ancora l'inoculazione per la camera anteriore dell'occhio, ma i risultati quivi furono del tutto negativi.

Il liquido prescelto fu l'infuso di fegato a temperatura costante, nella soluzione di $^{100}/_{100}$.

Dai fatti raccolti si può tracciare una lista di tossicità diversa per le diverse vie così riassunta: *Il diverso grado di tossicità è generalmente in rapporto al diverso grado di assorbimento ed alla rapidità con cui ciò accade. Le diversità risultate tra le mortalità verificatesi per inoculazione per os e quelle per via rettale possono essere a ciò riferite ed a ciò devonsi riferire alcuni risultati contraddittori.* Anche a ciò deve riferirsi la grande quantità di liquido tossico necessaria a produrre la morte per via endo-peritoneale; l'azione protettiva dell'endotelio di questa superficie essendo abbastanza alta, in taluni casi 71.4, in altri 9.7.

Facile pure è la spiegazione del quadro morboso svoltosi sotto l'influenza della *inoculazione nella dura madre del cervello dove all'azione tossica più specialmente elettiva per gli elementi nervosi il filtrato spiega un'azione irritante, intrinseca alla natura stessa del liquido.*

Il grado morboso relativo è più specialmente quello di una eccitazione diretta delle zone cortico-motrici, tutte messe in azione ad un tempo. Ed è meraviglioso, come il quadro ceda e si risolva completamente, senza dare nuovi segni immediati all'azione nociva e deleteria degli elementi della corteccia; l'animale ripigliando la sua vita. Nei casi in cui si ebbe la morte, il reperto di sezione dette notevolissime iperemie delle meningi cerebrali, delle meningi del ponte e midollo allungato.

E' certo che l' inoculazione attraverso la *via sub-aracnoidale cerebrale è nella forma morbosa assai più classica e meno mortale* di quella verificatasi per la *via spinale* e del *midollo allungato*, ove la morte accade più rapidamente con minore quantità di liquido tossico, senza notevoli disturbi, piuttosto come se l'animale fosse a un tratto fulminato.

I fatti esposti riguardano i risultati ottenuti sulle prove di inoculazioni diverse fatte nell'animale più comune da esperimento cioè il coniglio.

Conveniva saggiare quali effetti si producessero negli altri mammiferi ed in qualche altro animale della serie dei vertebrati.

Non potendo esperimentare un gran numero di prodotti putridi fu scelto a preferenza quello di maggiore tossicità, cioè a dire il fegato nella preparazione di sua maggiore tossicità, concentrazione 1 : 1, temperatura 37°, ecc.

Il saggio di comparazione prescelto fu sempre l' inoculazione endovenosa per via della giugulare, al solito modo praticata. Gli animali saggiati collo stesso liquido furono il coniglio, la cavia, il cane, il gatto, il pollo. I risultati, salvo il diverso indice di tossicità, fu uniforme per tutti, ripetendosi in tutti la stessa forma morbosa che pel coniglio: disturbi della respirazione, contratture classiche dissociate, poi forma convulsiva generalizzata, attacco epilettico tetaniforme, morte.

Qui riportasi la tabella di gradazione delle diverse resistenze di tolleranza allo stesso infuso nei diversi animali.

Fegato di manzo, infuso nella proporzione di 1 : 1 alla temperatura di 37° per 7 giorni, inoculazione in giugulare:

Coniglio	dose tossica	mortale minima	1.0 ‰
Cavia	id.	id.	0.9 ‰
Cane	id.	id.	2.1 ‰
Gatto	id.	id.	8.5 ‰
Pollo	id.	id.	5.0 ‰

Questo rapporto differenziale tra le singole specie di animali non era del tutto costante e definitivo per ciascuna specie di rincontro alle altre. Nè si può dire si mantenesse costante per le diverse modalità d' inoculazione, nel senso che malgrado soventi la resistenza naturale alla tossicità dei prodotti putridi per l' infuso di fegato fosse quasi pari nel coniglio e

nella cavia, con tendenza a diminuire in questa, in un sol caso si ebbe un'eccezione in contrario, pel fatto che lo stesso liquido, mentre che era tossico in giugulare di coniglio a 2.2 in media, non lo era in giugulare di cavia che a 11 cc. ‰.

Parimenti mentre nelle diverse prove venne fatto di constatare che lo indice di tossicità nei cani in rapporto al chilo di peso era presso che pari all' indice di tossicità minimo dei conigli (per le inoculazioni endovenose in giugulare), la tossicità per inoculazione sottocutanea nei cani era di molto maggiore. Questa essendo per taluni casi di poco inferiore alla tossicità risultata alla prova endovenosa. Ecco le cifre di media dei singoli casi:

Coniglio	in giugulare	1 ‰	sottocute	4.5 ‰
Cane	id.	2 ‰	id.	2.0 ‰

Questa maggiore suscettività per via cutanea nel cane, non era sempre così pronunziata; in taluni infusi occorrendo talvolta dosi maggiori che non quelle volute per inoculazione endovenosa.

Una differenza notevole tra inoculazione in giugulare ed inoculazione sottocutanea si ebbe ancora nella cavia.

Quivi le differenze essendo contrassegnate dal rapporto tra 1.8 e 9.0. Una tossicità manifestamente minore si ebbe nel pollo dove fu necessaria una dose minima mortale di 5 cc. ‰; e per taluno infuso mentre si ebbe la morte del coniglio nella dose di 113 ‰ (albume di uovo) in esso non dette alcun disturbo. Una tossicità ancora più alta da noi fu ottenuta pel gatto, 8.5, malgrado questo animale fosse ritenuto il più suscettivo.

I dati tutti esposti sono da riferirsi a filtrato di infusi alla carta bibula immediatamente inoculati in giugulare. Poi che era indispensabile per la comparazione della diversa tossicità operare con materiale preparato facilmente, di recente, e non soggetto a variazioni accidentali di tempo, di aria, di luce, di temperatura, di successiva diversa concentrazione. Ma esaurite le prove generali era ancora indispensabile rendersi conto della variabilità che i filtrati offrissero alle diverse contingenze per poterne meglio poi indagare possibilmente coi caratteri molteplici la loro natura.

Anche per queste riprove fu prescelto il filtrato di fegato; dopo avere esperimentato alquanto saltuariamente ora questo, ora quell'infuso, lo preferimmo per la sua maggiore tossicità.

Una prima serie di esperimenti fu indirizzata a studiare quale influenza spiegasse l'azione della temperatura sulla tossicità dei prodotti putridi dell' infuso di fegato, dello infuso di milza, di altri infusi. E dapprima fu saggiata l'*azione del calore a 60°, poi l'azione del calore a 100°* per 5 minuti e poi per 10 minuti.

In tali esperimenti una sola volta in 18 prove la tossicità da 5 cc. e frazioni diminuì a 14 e frazioni; tutte le altre volte la tossicità restò inalterata. Dopo ciò fu saggiata ancora l'azione della *temperatura* nell'*autoclave* alla pressione di *3 atmosfere per 23'* e la tossicità non solo non diminuì ma aumentò sensibilmente da 5.5 a 4.2.

Un tale aumento non notevole, ma costante in pochi decimi di grammo si ebbe in tutte le riprove successive. Che anzi risaggiando quale influenza esercitasse l'azione prolungata di alta temperatura su tali prodotti filtrati a carta bibula, risultò che colla *maggiore concentrazione la tossicità aumentava sino a giungere ad un massimo, altrimenti non raggiunto.* Così un infuso di fegato che alla prima filtrazione dette una tossicità di 5.5 dopo la dimora in autoclave per 20′ a 3 atmosfere di pressione dette 4.2.

Dipoi durante un riscaldamento prolungato, per cui il volume venne ridotto (a bagno maria) ad ½ la tossicità aumentò a 3 ‰ e successivamente lo stesso filtrato ridotto ad $^{1}/_{10}$ di volume dette una tossicità di 0.7 ‰.

Tuttavia come diversi infusi davano diversa tossicità, del pari infusi proporzionalmente tossici ridotti ad equivalenti volumi, non davano esattamente lo stesso aumento di tossicità; così 150 grammi di un infuso di fegato dalla tossicità prima di 5.7 ridotto a 15 cc., dettero una tossicità massima di 1 cc. mentre altra volta, altro infuso analogo, aveva dato una tossicità di 0.7. Naturalmente anche parte di questa variazione può addebitarsi a diversa sensibilità individuale dell'animale di esperimento senza però escludere del tutto più peculiari qualità degli infusi stessi.

Così a un tempo si è venuto esponendo come l'azione del calore e il grado di concentrazione sommandosi, anzichè esercitare un'azione riduttiva sulla tossicità dei prodotti di putrefazione e più specialmente dei suoi filtrati, l'aumentasse notevolmente e si deve rilevare che sui filtrati l'alta temperatura agisca inversamente all'azione spiegata sulle sostanze fresche, il cui protoplasma ne resta notevolmente modificato, e il potere tossico dei suoi prodotti di putrefazione diminuisce grandemente.

Un tale fatto meritava una riprova nel senso di determinare se del pari gli stessi filtrati ottenuti alla *candela Chamberland più che al filtro di carta svedese resistessero all'azione del calore.*

A tale intento fu preparato il solito infuso di manzo nella proporzione di 1 : 1 alla temperatura di 37° per 7 giorni. Quindi per procedere speditamente fu filtrato a carta bibula e questo filtrato rifiltrato alla candela Chamberland. La tossicità del nuovo filtrato saggiata in giugulare di coniglio da 5. 3 si era ridotta a 5. 8 (differenza poco apprezzabile), quindi veniva trasportato in termostato, in tubi perfettamente sterili e risaggiata la tossicità. Portato a bagno maria il filtrato venne ridotto a ½ e quindi al $^{1}/_{10}$.

E nelle diverse riprove la tossicità dette i seguenti risultati:

Infuso di milza di manzo di 1 : 1 di diluizione, filtrato a carta bibula, tossicità 5. 3 %;

Infuso di milza di manzo di 1 : 1 di diluizione, filtrato a candela Chamberland, tossicità 5. 8 %;

Infuso di milza di manzo di 1 : 1 di diluizione, in tubi sterili conservati al termostato, tossicità 4. 8 %;

Infuso di milza di manzo di 1 : 1 di diluizione, ridotto a bagno maria al ½, tossicità 0. 8;

Infuso di milza di manzo di 1 : 1 di diluizione, ridotto a bagno maria al $^{1}/_{4}$, tossicità 0. 6.

Il filtrato di fegato venne anche ridotto di *volume al ½ alla pompa di Weber, alla pressione di 44 m/m e quindi fu saggiata la tossicità del liquido residuale concentrato e del liquido di distillazione.* Ecco i risultati ottenuti.

Liquido di fegato filtrato a carta svedese tossicità cc. 1.8 ‰; liquido concentrato, leggermente sciropposo separato in due strati, l' uno superiore più limpido, l'altro inferiore torbido, spesso; la parte superiore dette un indice di tossicità pari a cc. 0.8. Il liquido distillato limpido, acquoso, dette tossicità mortale a cc. 17° ‰. La forma in questo ultimo caso fu identica a quella data dagli altri due saggi.

I *filtrati chiusi in tubi alla lampada sterilizzati a 80° per 3 giorni successivi* non *perdettero nulla della loro tossicità* nè *dopo 3 mesi*, nè dopo *6 mesi*, *sia conservati all'oscurità*, *sia abbandonati* alla *luce solare*, che anzi per taluni si potettero riscontrare quelle variazioni di aumento di già rilevate per i filtrati trattati all'autoclave

Per contrario la tossicità non restava sempre inalterata dopo lungo tempo per quegli infusi, i quali non erano completamente al riparo dell'aria. Accadde così che tubi con filtrato di fegato fenduti occasionalmente all'estremità, perdettero della tossicità dopo un mese e più riducendosi da 3.3 a 11 cc.

Lo stesso fatto fu riscontrato in riprova con altri filtrati lasciati per proposito aperti all' aria in comparazione di altri chiusi alla lampada. In un periodo di tempo più breve la tossicità non si modifica. Saggi fatti comparativamente tra filtrati conservati all'aperto e filtrati chiusi alla lampada non dettero nessuna variazione, neppure quella accidentale e trascurabile tra animale ed animale nei limiti di 10-40 giorni.

Infine fu saggiato *se i prodotti tossici della putrefazione fossero fissati dalla sostanza nervosa al modo che accade per le tossine del tetano.* A tale uopo si fece emulsione a parti eguali di peso di filtrato tossico titolato e cervello di agnello.

L'emulsione si lasciò in deposito per 2-6 ore. Quindi il tutto fu nuovamente filtrato a carta bibula. Il filtrato così ottenuto fu inoculato in giugulare di coniglio. In cinque esperimenti il risultato fu completamente negativo. La tossicità del liquido emulsionato non diminuì. Anzi si ebbe un lieve aumento, forse imputabile più probabilmente a variazioni di resistenza individuali.

IV.

Finito l'esame delle proprietà più importanti dei filtrati al punto di vista della loro tossicità fu ricercato, se questi avessero o no *potere immunizzante;* se cioè l'organismo di animali, a cui fossero iniettati in dosi tossiche non mortali, ripetute volte, reagisse convenientemente da

dare un anticorpo con siero che riescisse ad immunizzare animali sani contro i prodotti solubili della putrefazione, sia agendo *in vitro*, sia agendo preventivamente sugli animali.

Il liquido prescelto fu il filtrato d'infuso di fegato alla diluzione di 1 : 1 a temperatura costante di 37° per 10 giorni, filtrato per carta bibula, conservato in tubi chiusi alla lampada, sterilizzati per tre giorni successivi per un'ora alla temperatura di 80'. Tale filtrato così preparato e conservato avea una tossicità media mortale di 3. 4 ‰, una tossicità minima mortale di 4. 8 ‰, una tossicità massima di 2. 8. Il potere tossico malgrado il tempo e la luce si manteneva inalterato. Gli animali di esperimento furono il coniglio e il cane.

Una prima serie di ricerche fu istituita inoculando per via ipodermica dosi frazionate di filtrati, gradatamente aumentando ogni 5 o 3 giorni da 1 cc. a 4-10 cc., corrispondenti a 0.11 % di peso in kg. insino a 1.0 o 2 % nei conigli, ad 1.0 o 2 % nei cani, per un periodo totale da 20-25 giorni.

In tali esperienze malgrado ogni maggiore cura di antisepsi ed asepsi si ebbe a lamentare una grande perdita di animali, poi che le iniezioni ipodermiche davano luogo facilmente a suppurazioni e vere necrosi dei tessuti con perdite di sostanza. Tali alterazioni riparavano piuttosto sollecitamente, se si soprassedeva alle prime inoculazioni, diversamente si estendevano sempre più.

Il fatto si produceva soventi alla seconda o terza inoculazione nei conigli, appena si aumentasse la dose; si produceva soventi nei cani anche alla prima inoculazione. L'alterazione dei tessuti era da attribuirsi alle qualità specifiche necrotizzanti del filtrato, poichè essa si produceva rapidamente con liquidi perfettamente asettici e per inoculazioni praticate colle maggiori cure antisettiche e cogli stessi liquidi che inoculati in quantità non mortali per via endovenosa lasciavano in vita gli animali. Ma talvolta anche in seguito ad inoculazioni endovenose si avevano necrosi cutanee, specie in corrispondenza di traumi, come ad esempio nel sito delle legature degli arti degli animali fissati sul tavolo di esperimento.

Per i fatti su riferiti, le difficoltà di immunizzare gli animali senza alcun incidente che potesse disturbare il processo di produzione di anticorpi nel siero di sangue degli animali inoculati, non era possibile evitare facilmente, nè sicuramente. Tuttavia su un buon numero di conigli e cani si riuscì ad avere taluni esemplari che con le maggiori precauzioni non dettero fatti, i quali potessero disturbare l'azione dei prodotti di putrefazione sull'organismo.

Ecco i reperti relativi:

Coniglio peso 1625, inoculato sottocute con liquido da infuso di fegato come detto precedentemente (diluz. 1 : 1, T. 37°, 10 giorni, filtrato, chiuso in

tubi sterilizzati a 80′ per 3 giorni ad un'ora al giorno. Tossicità minima mortale 4.8, media 3.4, massima 2.8).

8	febbraio	cc. 1	Peso del coniglio	gr.	*1625*
13	»	» 1	»	»	*1585*
14	»	» 1	»	»	—
15	»	» 3	»	»	—
17	»	» 3	»	»	—
18	»	» 4	»	»	—
19	»	» 4	»	»	—
20	»	» 5	»	»	—
21	»	» 5	»	»	*1425*
22	»	» 5	»	»	—
23	»	» 5	»	»	—
24	»	» 5	»	»	—
25	»	» 6	»	»	—
27	»	» 6.5	»	»	*1425*
		cc. 54.5			

Il 3 marzo si toglie sangue dalla giugulare e l'animale muore coi sintomi dell'anemia acuta.

Durante il periodo di esperimento l'animale non avea dato alcun segno di disturbi generali, meno che una certa debolezza e depressione alla prima iniezione. Nessun disturbo nella sfera del sistema nervoso.

Per utilizzare la poca quantità di siero tolto dal sangue del coniglio si fanno le prime miscele con filtrato di alto potere tossico (cioè 0.7 ‰) con questo liquido si fanno 2 miscele: l'una nel rapporto di cc. 1.5 di siero con 5 cc. di filtrato; l'altra nel rapporto di cc. 3.5 a 5 cc., equivalenti vicendevolmente a $^3/_{10}$ e $^7/_{10}$.

L'inoculazione in giugulare di coniglio dà questi risultati:

Miscela $^3/_{10}$ dà morte con cc. 2.2 ‰ = 1.5 di filtrato
» $^7/_{10}$ dà morte = 3.5 di filtrato

Con altro filtrato tossico nella misura di 4.1 quale minimo mortale si fa miscela nel rapporto di 1 a 3.

Questa miscela inoculata in giugulare di coniglio nella quantità di 5.7 ‰ di miscela ha dato il quadro classico dell'intossicazione senza dare la morte immediata dell'animale, il quale sopravvive 4 ore. Sì che 3.4 ‰ di filtrato tossico al potere minimo mortale di 4.1, miscela di $^1/_5$ non hanno dato la morte immediata dell'animale, ma non lo hanno preservato in alcuna guisa.

La stessa miscela inoculata in giugulare nella dose di filtrato mortale di 6 cc. ha dato la solita forma morbosa classica di contratture, convulsioni e disturbi della respirazione insino all'apnea con cianosi e perdita dei riflessi; poi lentamente è risoluta. L'animale tolto dal tavolo operativo ha presentato paraplegia anteriore. Quindi ha ripreso le forze ed ha mangiato. Dopo 24 ore vive, mangia, cammina, con semplice astenia del treno anteriore; nei giorni successivi l'astenia scompare.

Coniglio del peso di 2410 grammi inoculato per via sottocutanea del solito filtrato conservato in tubi chiusi, della tossicità di 3.4 $^{0}/_{00}$ in media, della tossicità minima mortale di 4.1.

8	febbraio	cc.	1	Peso del coniglio gr. *2410*
13	»	»	0.5	» » *2255*
14	»	»	1.5	
15	»	»	5	
16	»	»	7	
17	»	»	10	molto abbattuto con ispessimento nel punto della inoculazione.
20	»	»	5	
21	»	»	5	
22	»	»	5	
23	»	»	5.5	
24	»	»	5	
25	»	»	6.5	
27	»	»	5	abbattuto per 36 ore
		cc.	65.0	Peso del coniglio gr. *2350*

Il 2 marzo tolto sangue dalla giugulare. La miscela di siero e filtrato a parti eguali dà la morte per kilo di coniglio a 4.1 $^{0}/_{0}$ di tossicità. Cane del peso di 12 chili. Liquido d'inoculazione filtrato di fegato da infuso alla diluzione di 1 : 1 a T. 37° ecc., sterile, della tossicità media di 2 $^{0}/_{00}$ in giugulare di coniglio.

Il 3 settembre	s'inoculava	sottocute	alle	8	4 cc.
»	»	»	»	16	20
					24

Dopo la 2ª inoculazione l'animale ha avuto respirazione profonda, astenia. Non ha mangiato. E' restato abbattuto. Lentamente si è riavuto. Ha ricominciato a mangiare. Al punto della inoculazione si è avuto pastosità, lieve suppurazione. E' presentemente guarito.

Il giorno 8 settembre. S'iniettano ipodermicamente 50 cc. dello stesso liquido. Non si è avuta nessuna reazione locale. Ma l'animale è molto abbattuto.

Il 17 settembre s'inoculano sotto cute 45 cc. dello stesso liquido. L'animale per 12 ore è abbattuto.

Il 25 settembre l'animale è inoculato sottocute di 70 cc. dello stesso filtrato. Dopo l'inoculazione l'animale è molto abbattuto. Ha respirazione frequente. Non si regge in piedi, devia spesso sul lato destro. Non mangia. Dopo 24 ore si ha reazione locale.

In 22 giorni sono stati iniettati sotto cute 139 cc. di filtrato in tre periodi differenti.

Si estrae sangue dalla giugulare. L'animale muore dopo 72 ore.

Si fa miscela *in vitro* del siero dell'animale a parte eguale col filtrato. Questa miscela inoculata in giugulare di cane dà la morte dell'animale nella proporzione di cc. 2. 5 $^{0}/_{00}$.

Cane di 4 chili. S'inoculano ipodermicamente 50 cc. di siero. Dopo 30' s'inocula in giugulare il solito filtrato e l'animale muore dopo 8 cc. in rapporto a 2 °/₀₀ di peso.

Cane di chili 5,200 inoculato ipodermicamente di 20 cc. di siero.

Dopo 24 ore è inoculato in giugulare collo stesso filtrato solito. L'animale muore dopo 4.6 cc. di liquido, cioè nella misura di 8.8 °/₀₀.

Cane di 19 chili. Il 24 maggio 1905, s'inoculano in giugulare 10 cc. = 0.51 °/₀₀ di liquido solito di filtrato ecc. Tossicità minima mortale in giugulare di coniglio 4, media 3.7, minima 2.5. L'animale ha sopportato molto bene l'inoculazione. Ha riposato, ha mangiato. E' svelto e di buon umore, solo immediatamente dopo l'inoculazione ha mostrato lieve debolezza ed una certa depressione. La ferita al collo è rapidamente cicatrizzata. Alla gamba posteriore destra ha presentato una chiazza necrotica grande, quanto un 5 franchi. Questa necrosi è prontamente riparata. L'escara si è staccata. La superficie granulante si è rapidamente ricoperta di cute.

Il 5 giugno s'inoculano in giugulare 19 cc. = 1 °/₀₀ di peso. Verso la fine dell'inoculazione ha presentato le solite modificazioni del respiro, prima frequente, poi profondo, indi stertoroso.

Successivamente non si è notato alcun che di speciale. Solo la presenza di un'altra necrosi dell'altro arto posteriore in corrispondenza della legatura dell'arto, fatta per fissarlo sul tavolo operativo. Anche questa riparò prontamente.

Il 10 giugno si fa la terza inoculazione in giugulare col solito liquido tossico. La quantità inoculata è 30 cc. = 1.5 °/₀₀ di peso di animale. Anche questa volta ha presentato alterazione del respiro, divenuto frequente, profondo, stertoroso. Il disturbo si è prolungato. Ha avuto defecazione e borborigmi.

Indi comincia a battere la coda. L'animale si rianima. La respirazione si ripristina. Sciolto dal tavolo anatomico non presenta nulla di speciale.

In riassunto l'animale ha avuto inoculato in giugulare 59 cc. di filtrato, tossico, alla dose minima mortale di 4 cc. in giugulare di coniglio. La quantità totale è stata inoculata in 3 volte alla distanza media di 6 giorni. Al 24° giorno si è estratto il sangue dalla giugulare per esperimentarne il siero.

Si fa miscela nelle proporzioni di 5 di siero e 20 di filtrato solito, di tossicità minima 4.1 °/₀₀ in giugulare di coniglio del peso di gr. 850; questo muore colla forma solita di convulsioni, dopo inoculazione di cc. 4.2 di miscela equivalente a 3.7 di filtrato.

Si fa nuova miscela nella proporzione di 10 di siero e 20 di filtrato in giugulare di coniglio del peso di gr. 1000. L'animale muore colla solita forma dopo l'inoculazione di cc. 6.6 di miscela, pari a 3.3 di filtrato.

Coniglio del peso di gr. 1200, s'inocula in giugulare di 10 cc. di siero. Dopo 30 minuti s'inocula ancora in giugulare il solito filtrato. L'animale muore della solita forma dopo inoculazione di cc. 3.9.

Coniglio del peso di gr. 1100 s'inocula sotto cute di 10 cc. di siero. Dopo 24 ore s'inocula in giugulare il solito filtrato. L'animale muore colla solita forma dopo 3.2 cc.

Coniglio del peso di gr. 950, s'inoculano in giugulare 10 cc. di siero.

Dopo 24 ore s'inocula in giugulare il solito filtrato. L'animale muore al solito modo dopo inoculazione di cc. 3.7 di filtrato.

Il siero mescolato a parti eguali col filtrato solito ha dato un precipitato sensibile alla vista, precipitato fiocconoso biancastro non molto abbondante.

Per assicurarci se tale azione precipitante fosse specifica abbiamo preparato del siero di cane normale e lo abbiamo mescolato nelle identiche proporzioni al filtrato solito.

Il risultato è stato simile, anche qui si è avuto un precipitato fiocconoso biancastro, poco abbondante.

Il siero del cane, immunizzato artificialmente, mescolato a brodo normale, non ha dato alcun precipitato.

Evidentemente il siero di sangue di cane immunizzato coi prodotti tossici della putrefazione non ha dato reazione alcuna sul filtrato tossico.

Da tutti questi esperimenti appare in modo evidente che gli animali sopportavano inoculazioni di filtrato tossico sempre crescenti e che essi si adattavano acquistando un grado di resistenza sempre più alto, dalle prime inoculazioni, alle quantità maggiori. Un tale grado di tolleranza aveva per altro un limite, al di là del quale la morte dell'animale si produceva in maniera rapida col solito quadro morboso.

Tale tolleranza si sviluppava gradatamente e proporzionalmente alla dose inoculata, al periodo di tempo impiegato, alla via prescelta. Così, come apparve dagli esperimenti riportati e da altri non riportati, la tolleranza era minore, se l'inoculazione era fatta in giugulare e di poi se fatta ipodermicamente ed infine se il liquido fosse stato somministrato per *os.* Le proporzioni si mantenevano quali sono state già tracciate negli esperimenti fatti per determinare le differenze tossiche dimostrate ai liquidi per le diverse vie di assorbimento. Così il filtrato di tossicità minima mortale in giugulare di 3.3 ‰ era tollerato alla dose di 2 per via ipodermica, era tollerato alla dose di cc. 10 per *os.* E successivamente si poteva raggiungere la cifra di cc. 80 per ‰ per *os.* Non si poteva spingere al di là di 5 cc. per via ipodermica. Malgrado ciò anche animali i quali sopportarono bene quantità discrete e rilevanti di liquido senza apparenti reazioni e sintomi morbosi, morti accidentalmente presentarono lesioni sensibili istologiche nei diversi organi parenchimali; quale il rigonfiamento torbido delle cellule e dei tubuli contorti e delle anse di Henle ed alterazioni delle cellule ganglionari del sistema nervoso.

Ma a parte l'immunità relativa acquisita in tutti gli animali, con cautela e metodo trattati diversamente, *non fu possibile ottenere da alcuno di essi un siero a proprietà specifiche atte a neutralizzare, sia in vitro, sia nell'organismo animale, il potere tossico dei filtrati adoperati.* E qualche oscillazione verificatasi è da attribuirsi assai più a condizioni speciali diverse dei differenti animali, anzi che a vera azione im-

munizzante. Ciò si desume pel modo preciso e quasi matematico con cui al filtrato campione hanno corrisposto tutti gli animali inoculati colle diverse miscele preparate e nel diverso modo praticate, sia ad azione immediata sia ad azione preventiva; la morte essendo accaduta con precisione costante nei termini della tossicità media di già sperimentata pel filtrato campione.

E' notevole ancora che il siero degli animali preparati per ottenere l'immunizzazione non ha dato segno alcuno di reazione specifica precipitante sul filtrato tossico.

V.

Dallo studio della forma morbosa prodotta dai veleni della putrefazione si sarebbe indotti facilmente a ravvicinare le tossine di questi prodotti alle tossine più specifiche del sistema nervoso, quali quelle del tetano, del botulismo. Tuttavia ad un esame appena più minuzioso appare subito che i caratteri di queste sono essenzialmente diversi dai caratteri di quelle.

Per le tossine del tetano si sa che quantità infinitesimali sono capaci di uccidere un animale da esperimento di vario peso, che il pollo e la rana mostrano una immunità relativa molto alta, che l'inoculazione nel cervello dei polli produce rapidamente la morte, che la sostanza nervosa fissa le tossine del tetano in vitro. Ora dal confronto dei dati rilevati dagli esperimenti svoltisi risulta per contrario che il pollo non è refrattario ai veleni della putrefazione, che l'inoculazione sub-aracnoidale del cervello in coniglio pure dando una forma classica di disturbo non conduce alla morte con una quantità minima di liquido inoculato. Infine l'infuso di terreno di ospedale al 1 % ed 1 % con brodo dette una tossicità di molto inferiore agli altri infusi. L'emulsione di sostanza nervosa con filtrato tossico non ne diminuisce la tossicità.

Per il botulismo le differenze sono del pari sensibili. In questa forma la predilezione di sede pel sistema nervoso è veramente il midollo allungato: però quivi rapidamente si svolge il processo, il quale giunge ad intaccare la vitalità tutta degli elementi cellulari e disintegrarli, dando luogo ad una vera forma di oftalmoplegia esterna e paralisi degli altri nervi cerebrali. Ora nei numerosi esperimenti fatti non ci è accaduto di ottenere alcuna sindrome morbosa analoga a quella del botulismo.

Tuttavia anche nelle forme di avvelenamenti da prodotti putridi ci occorse osservare alterazioni istologiche del sistema nervoso, mai de-

scritte innanzi, anche qui localizzatesi più specialmente nel midollo allungato e pigliando a preferenza gli elementi cellulari motori. Viceversa una distinzione veramente notevole si ha nel fatto che le tossine del botulismo non resistono ad alta temperatura e la tossicità dei prodotti putridi non muta neppure alla prolungata temperatura di 120°.

Se si volessero passare in rassegna i disturbi funzionali delle diverse tossine meglio conosciute, quali quelle della difterite, sarebbe facile trovare analogie per l'insieme dei disturbi nervosi e diversità per i caratteri fondamentali chimico-fisici di queste tossine di fronte alle altre Una diversità funzionale di non poco valore tra la tossina difterica e i prodotti della putrefazione deve essere l'azione da quella spiegata sul cuore. Anche clinicamente le paralisi cardiache da difterite sono riconosciute da tempo come un pericolo da invigilare. Ora è appunto il cuore quello che meglio resiste nelle intossicazioni dei prodotti putridi, sì che mentre in tali intossicazioni più o meno rapidamente tutte le altre funzioni cessano, il cuore continua lungamente a battere anche a torace aperto, anche a cuore distaccato dal corpo. Tale resistenza del cuore fu veramente sorprendente in un caso. Inoculato per *os* un coniglio successivamente per intossicazione progressiva in seguito ad una inoculazione più abbondante al 20° giorno fu ritenuto morto. Avea perdita dei riflessi congiuntivali, risoluzione muscolare completa, assenza del respiro. Per difetto di tempo l'autopsia fu procrastinata di 12 ore e fu con grande sorpresa che dopo aperta la cavità addominale, nell'aprire la cavità toracica si notò che il cuore continuava a battere e continuò lentamente a battere anche staccato dal corpo per più di trenta minuti.

Un altro carattere importante che allontana queste tossine dalle altre su accennate del tetano e della difterite è la reazione che queste producono nell'organismo animale eccitando speciali produzioni di sostanze antitossiche da avere potere immunizzante inoculate in altri individui. Ora questa reazione biologica pei prodotti putridi nelle numerose riprove è mancata interamente. Ed è mancato ancora un altro segno di reazione da parte dell'organismo cioè qualsiasi precipitato del siero di sangue dell'animale preparato per l'immunizzazione sul filtrato di scelta. Manca ogni accenno di precipitine dimostrabili, le quali rappresentano la reazione di anticorpi o ricettori liberi nel siero di animali a ciò preparati.

Le maggiori analogie questi prodotti putridi le mostrano per taluni caratteri generali, come la resistenza ad alta temperatura, la mancata produzione di antitossine, con taluni bacilli del colon isolati da cadaveri morti per avvelenamenti da carne (Fischer), col bacillo di Gaertner

e con talune tossine isolate dal Cassedebat da culture ottenute da conserve di carne, e col succo di queste carni stesse.

Anche i prodotti di cultura dei microrganismi isolati dal Cassedebat aveano per la via gastrica una minore tossicità che inoculati in vena, e talvolta riescivano innocui. Però egli operava con liquidi tossici non titolati.

Tale differenza fu notevolissima nei nostri esperimenti sino a dover raggiungere la quantità di *100 cc.* °/₀₀ di peso di un infuso tossico in giugulare alla dose di cc. 4.1 (minima mortale). Tanto diversa intensità di reazione tra la via venosa e la gastrica fu di già spiegata al modo di Bouchard, che le tossine messe nel torrente circolatorio pel circolo portale, attraverso il fegato vengono modificate ed eliminate; quantunque una tolleranza maggiore della endovenosa è dimostrata anche dalle vie peritoneale ed ipodermica, sebbene in minore proporzione.

Pertanto una tale enorme tolleranza per via gastro-intestinale nei conigli, per il più tossico degli infusi, fino a mancare la morte ad una quantità di *100 cc.*, convalida l'opinione che nel maggior numero dei casi dei così detti avvelenamenti da carne si abbia a fare con vere forme di infezione, e l'intossicazione, ove accade, sia secondaria a germi infettivi di speciale virulenza naturale od acquisita e forse esaltata in presenza dei prodotti della putrefazione od anche per diminuita resistenza organica fiaccata dai prodotti della putrefazione stessa.

Che i prodotti della putrefazione possano diminuire notevolmente la resistenza organica ho potuto sperimentare su me stesso. Queste ricerche furono iniziate nell'ottobre 1903 e sono state terminate nell'ottobre 1905. A capo di 3 mesi, senza cagione apprezzabile, lentamente la mia resistenza organica diminuì e fui colto da febbre che procedette per 3 mesi alquanto intermittente, a periodi continua, con un massimo di 38.5 e 39, con notevoli fenomeni d'intolleranza gastrica, e fatti bronchiali, di cui guarii dopo lunga convalescenza. Durante la convalescenza soffrii notevole astenia con dolorabilità agli arti inferiori. Il Sanfelice ed io ci formammo il concetto che per lo meno il lavorare in ambiente ove erano grandi esalazioni di prodotti putridi non era stato indifferente a preparare una tale febbre di infezione. Che poi i prodotti volatili della putrefazione abbiano potere tossico si è chiaramente dimostrato dalla tossicità mortale ottenuta coi prodotti di distillazione nella serie di esperimenti precedenti. D'altra parte dopo quel tempo, malgrado fossi in piena salute, malgrado pigliassi le maggiori precauzioni a procedere negli esperimenti, tutte le volte che proseguivo nelle ricerche in continuità, senza tregua, sentivo le mie energie diminuire, con accessi di malessere generale, astenia, cefalea, anoressia,

nausee. Le esalazioni dei prodotti putridi aveano ancora una notevole influenza sull'albero respiratorio. Esse riescivano particolarmente irritanti, sicchè senza cagione di raffreddamento, il semplice respirare in ambiente ove si procedeva alle filtrazioni, cagionava irritazione laringotracheale e bronchiale, con tosse e lieve secreto mucoso. I quali fatti presto disparivano solamente col porre una certa tregua nella ricerca, e riapparivano nuovamente col ripigliare gli esperimenti insino a quando le filtrazioni furono fatte in tutt'altro ambiente e lontano dal luogo degli esperimenti sugli animali.

Che poi taluni microrganismi della putrefazione siano capaci di esaltare gli altri microrganismi è provato dalle esperienze del Monti sul *Proteus* e i diplococchi, essendo riuscito col *Proteus* a ridare virulenza a diplococchi che l'aveano di già perduta.

Il fatto inoltre che le epidemie da avvelenamenti (da carni sopratutto) non sempre sono accompagnate da grande mortalità, prova la grande tolleranza e disposizione individuale alla reazione dei prodotti putridi, o alla recettività di speciali tossine e attecchimento di speciali microrganismi.

Un altro fatto che deve rilevarsi si è che alimenti a contenuto alto di sostanze quaternarie abbiano dato un indice di tossicità relativa assai basso. Tali sono il latte, che nella quantità di 238 cc. iniettato in giugulare non dà la morte; l'albume d'uovo che dette la morte in coniglio solo con 113 cc. in giugulare, e non dette la morte inoculato in giugulare di pollo; il torlo d'uovo dette la morte solo con 78 cc., i funghi con 78.3 cc.; le ostriche con 60 cc. Ora questi dati furono comprovati più volte.

Sicchè è a ritenere che i prodotti di una ordinaria putrefazione (più facilmente incriminati) per agire per le proprietà tossiche dovrebbero essere ingeriti in tale grande quantità che non corrisponde alle contingenze giornaliere, tanto più se si pensa che ad ottenere la morte dal potere tossico delle sostanze ingerite deve elevarsi il quantitativo ad un volume 25 volte maggiore di quello introdotto per vena, e ciò per le sostanze che hanno dato la maggiore tossicità, come per gli infusi di fegato. Quali dovrebbero essere le quantità degli altri ordinari alimenti incriminati? Sì che anche per ciò deve supporsi che speciali contingenze possono dare prodotti di virulenza maggiore in singoli casi o per speciali microrganismi occasionalmente capitati, o per accidentali condizioni. Ma tali peculiarità non possono rientrare nelle valutazioni degli effetti da attribuirsi ai prodotti di un'ordinaria putrefazione.

Conclusioni.

1. Tra tutte le sostanze alimentari vegetali e animali e tra queste, in tutta la serie animale tolta in esame, il maggiore indice di tossicità fu dato dai prodotti di putrefazione del fegato, poi dai prodotti di putrefazione della milza, quindi dai prodotti di putrefazione del rene. L'indice di tossicità dei detti organi pei diversi animali si mantenne oscillante con differenze minime.

Tra i diversi organi l'indice di tossicità più basso fu dato dal cervello, dalle glandole linfatiche, dal pancreas.

L'indice di tossicità delle diverse carni dette differenze con oscillazioni grandi di 2-3 diecine di ccm.

L'indice di tossicità più basso fu dato dalle carni del pollo.

Tra le altre sostanze del regno animale tolte dai vertebrati l'indice più basso di tossicità fu dato dal sangue, dal grasso, dall'albume di uovo, dal latte.

Tra i crostacei e molluschi la tossicità maggiore fu data dall'aragosta, la minore dalle vongole.

Tra i vegetali la tossicità maggiore fu data dai vegetali secchi: fave, piselli, caffè; fu minore per i vegetali freschi, specie i funghi.

2. Condizioni che più favoriscono l'indice di tossicità sono: la temperatura costante di 37°, la diluzione di 1 : 1 di sostanza ed acqua, lo stato anerobico di conservazione.

Il tempo attenua lentamente l'indice di tossicità — conservando gli infusi all'aria — non l'attenua per mesi ed anni, se conservati anerobicamente.

3. La forma morbosa svoltasi sotto l'influenza tossica dei diversi prodotti è la convulsiva. Nessuna distinzione si è potuta rilevare in rapporto ai differenti infusi delle diverse sostanze.

I primi fenomeni a comparire sono i disturbi respiratorii. La funzionalità dell'organo più resistente è quella del cuore.

4. Tra le diverse vie d'inoculazione dei prodotti l'endovenosa e la subaracnoidale spinale danno fenomeni più rapidi, più gravi, con dosi minime. Per le vie gastriche, rettali, endoperitoneali, sottocutanee occorrono dosi 25, 10, 5 volte maggiori.

5. Nelle intossicazioni croniche oltre le alterazioni del fegato e dei rene si ritrovano alterazioni istologiche degli elementi gangliari del midollo allungato, del midollo spinale, della corteccia cerebrale.

6. L'indice di tossicità dei filtrati non è influenzato dal calore di 100°, 120° nemmeno a pressione di 1, 2, 3 atmosfere. Esso si eleva

colla concentrazione del liquido al calore; restava immutato per mesi ed anni conservato in tubi chiusi alla lampada, anche se esposti alla luce.

7. Il distillato del filtrato è anche tossico, con un indice più basso dell'indice dell'infuso.

8. I diversi infusi putridi determinano nei conigli e nei cani speciali adattamenti, acquistando gli animali un indice di tolleranza sempre maggiore alle dosi inoculate in quantità sempre crescenti — insino a un certo limite.

L'infuso putrido di fegato non determina negli animali di prova (conigli e cani) alcun siero a proprietà antitossica.

9. La forma morbosa determinatasi sotto l'influenza dei diversi infusi mette i prodotti di putrefazione tra le sostanze più tossiche del sistema nervoso. La natura degli stessi, colle peculiari caratteristiche rilevate, li mostra essenzialmente dissimili dalle tossine del botulismo, del tetano, della difterite. Si avvicinano all'azione tossica del B. enteritidis e dei paratifi in genere.

10. Dalle ricerche attuali non riesce chiarito il meccanismo di azione dei disturbi provocati accidentalmente da sostanze alimentari in putrefazione per via gastrica coi soli fatti d'intossicazione.

Messina, ottobre 1905.

BIBLIOGRAFIA.

ARSTAMOFF. *Ueber die Nature des Fischgiftes*. Centr. f. Bact., 1891, v. 10, p. 112.

BAILLOU. Arch. de médecine et pharmacie militaire, T. VI, 1888, p. 174.

BERGMANN e SCHMIEDELBERG. *Ueber das Schwefelsaure Sepsin*. Centr. f. m. Wissenschaft, 1868.

BIENSTOCK. *Recherches sur la putréfaction*. Annales de l'Institut Pasteur, 1899, p. 854.

BROSCH A. *Avvelenamento da ostriche*. Wiener klinische Wochenschrift, n. 13, 1896.

CARBONE. *Sui veleni prodotti dal « proteus vulgare »*. Accademia dei Lincei, anno 1890, p. 148-830,

CASSEDEBAT. *Bactéries et ptomaines des viandes de conserve*. Revue d'Hygiène, 1890, p. 569.

EHRENBERG. *Ueber einige Falle von Sogenannanten Wurstgiftung*. Zeitschrift für Physiologie und Chemie, Bd. XI, 1887, p. 239.

FOÀ e BONOME. Comunicazione Accademia di Torino, 16 dicembre 1889.

FRISCO. *Sull'azione dei veleni putridi nell'organismo animale*. Lavori dell'Istituto d'igiene di Palermo, 1894-95, pag. 17.

FRISCO. *Sull'alterazione del sistema nervoso nello avvelenamento per mais avariato*. 1894, pag. 75.

FRISCO. *Alterazione del fegato e dei reni determinate dai prodotti della putrefazione intestinale*. Lavori dell'Istituto d'igiene di Palermo, 1896, vol. II, pag. 69.

HOLST. *Bacteriologische Untersuchungen ueber die Massenvergiftung in der Irrenanstalt Ganstad in Jahre 1891.* Jahresber. BAUMGARTEN, 1894, p. 325.

HOLST. *Ueber Vergiftung nach dem Genuss von Kuettelkase.* Brift for den uorske Laegeformig, p. 355, 1896.

KELLER e JORKII. *Ueber die Entbindung freien Stickstoffe bei Fäulniss und Nitrification.* Centr. f. Bact., 1888, VI, p. 305.

KUHNE F. *Morphologische Beitrage zur Leichenfäulniss.* Arch. f. Hygiene, Bd. XIII, 1891, p. 40.

LOEW. *Die Chemischen Verhaltnisse des Bakterienlebens.* Centr. f. Bact, 1891, p. 659, 680, 722, 757, 789.

MONTI e TIRELLI. *Sui microrganismi del mais guasto.* Accademia dei Lincei, 1889, f. 7, v. II.

OESCHNER e CORNINCK. *Recherches sur les bases piridiques.* Montpellier, 1889.

PANUM. *Das Putride Gift Der Bacterien, die Putride Infection oder Intoxication und die Septicämie.* Virchow's Archiv, Bd. XI, 1874.

Poisoning By sardines toxic ptomaine. British Med. Journal, 17 dic. 1892, p. 1326.

POUCHET. *Des empoisonnements par les champignons.* Journal des praticiens, 13 marzo 1897. Revue d'Hygiène, p. 161.

ROVIGHI. *Azione dei prodotti tossici della putrefazione intestinale.* Semaine médicale, 30 ottobre 1895.

SANFELICE. *Contributo alla morfologia e biologia dei batteri saprogeni aerobi e anaerobi.* Atti dell'Accademia di Roma, 1890, p. 379.

SANTORI. *Ricerche batteriologiche sulla decomposizione putrida dei vegetali.* Questi Annali, 1891, v. I, nuova serie, f. 2.

SCHRANK F. *Untersuchungen den in Huehnerei Stinkende Fäulniss hervorrufunden Bacillus.* Wiener Medicin., 1888, p. 303.

SEGUILLON. *Empoisonnement vraisemblablement attribuable à l'ingestion de conserves de sardines. Recherches bactériologiques.* Gazette de méd. et chir., p. 221. Jahresbericht BAUMGARTEN, 1902, p. 591.

SEYBERT. *Ueber die Fäulniss in Blute an lebenden thierischen Körper.* Berl., 1758.

TAKE. *Ueber die Entwiklung von Stickstoff bei Fäulniss.* Centr. f. Bact., 1887, p. 705.

TISSIER o MARTELLY. *Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie.* Annales Pasteur, 1902, p. 865, v. 16.

VAUGHAM V. *Experimental studies on some points connected with the causation and treatment of summer diarroes of infancy.* Medical news, 1887.

VAUGHAM V. *Ueber die Anwesenheit von Tyrotoxin ins giftigen Eis und giftigen Milch und seine wahrscheinliche Beziehung zur Cholera Infantum.* Arch. f. Hygiene, Bd. VII, 1887, H. 4, p. 420.

WALLACE. *Case of cheese poisoning.* Med. news, v. II, 4, 3, p. 69.

WAUGHIN. *Avvelenamenti per gelati di crema da tyrotoxine.* Medical Record, 7 luglio 1896.

WEISS. Club medico viennese. Riforma medica, 1897, vol. I, p. 417.

WOLNY. *Untersuchungen ueber die Zersetzung der organischen Substanzen.* Centr. f. Bact., 1887, p. 137.

ZUGLER e SOMMENSCHEIN. Berl. klinische Wochenschrift, 1869.

ISTITUTO SIERO-VACCINOGENO ERITREO

Sopra un caso di "Haemogregarina bovis„

per il dottor **FERDINANDO MARTOGLIO**, tenente medico
e dottor **MATTEO CARPANO**, tenente veterinario.

(Con la Tav. III).

Le nostre conoscenze sul genere *Haemogregarina* (Danilewsky, 1885), erano, fino a prima del 1905, limitate solo a tipi riscontrati nei vertebrati a sangue freddo.

Ma le indagini che in questi ultimi tempi si vanno compiendo in tutti i laboratori sulla classe dei protozoi in genere e sugli ematozoari in ispecie, ci hanno mostrato essere più largo il campo in cui si esercita il parassitismo di questi esseri.

Così il genere *Haemogregarina* è stato ultimamente trovato anche nei mammiferi.

C. A. Bentley (1), nell'Assam, ha scoperto nei cani un parassita interessantissimo, poichè sarebbe il primo vero leucocitozoario. Esso attacca i leucociti polinucleati del sangue circolante. Il parassita, per la sua forma ricorda una emogregarina: corpo allungato, nucleo bene sviluppato, assenza di pigmento.

Questo parassita è stato studiato anche da S. P. Yames (2).

Balfour (3), a Khartoum, trova nel gerboa, o topo del deserto (*Jaculus jaculus*) un parassita del corpuscolo rosso, il quale, oltre le forme endoglobulari, presenta delle forme libere e mobili e delle cistocisti nel fegato e nel rene, le quali rappresentano lo stadio di schizonte del parassita.

Il Laveran ha classificato questa forma tra le *Haemogregarina*, chiamandola H. Balfouri.

Balfour ha oltre visto nei leucociti mononucleati del *Mus decumanus* una forma simile. Egli ancora non può dire se trattasi di una varietà distinta, e se questa forma rappresenta un vero leucocitozoario del *Mus decumanus*; o se, nel caso osservato, non si trovò di fronte ad un fenomeno di fagocitosi. Ha osservato la stessa forma, anche libera, in preparati colorati fatti dalla polpa splenica del *Mus decumanus*.

Laveran (4) ha poi ritrovato l'H. Balfouri nel gerboa della Tunisia (*Jaculus orientalis.*

Infine S. R. Christophers (5), a Madras, nel sangue del gerbillo dell'India (*Gerbillus indicus*) ha descritto una emogregarina a forma di rene, con estremi ricurvi, provvista di un inviluppo membranoso che rappresenta gli avanzi del corpuscolo rosso. Si può osservare nel corpuscolo stesso il fenomeno di riproduzione del parassita per via di una divisione binaria longitudinale. Nei preparati fatti con tagli del fegato, del rene e di altri organi non si trova niente di notevole. Nel sangue uscito da qualche minuto dai vasi si notano delle forme libere, affilate, mobili. Christophers crede che la fase sporogonica della *Haemogregarina gerbilli* si compia negli ectoparassiti del gerbillo (*Haematopinus* sp.).

Dato l'interesse dell'argomento, noi crediamo utile pubblicare la descrizione di un protozoo osservato in un bue, e che alla luce degli studi sopra citati crediamo dover classificare tra le *Haemogregarinae.*

Sulla fine dello scorso ottobre, nella scuderia dei buoi infetti di peste bovina, che si adoperano per iperimmunizzare i siero-produttori, si ammalò spontaneamente un vitello di razza *bogos*, di tre anni, proveniente da Cheren, notato al numero 635 del protocollo di laboratorio.

Secondo pratichiamo abitualmente per assicurarci della purezza del virus, la sera del 3 novembre furono fatte col sangue del suddetto animale quattro preparati su copri-oggetti, che, osservati la mattina seguente, presentarono in scarso numero uno speciale parassita a forma allungata e provvisto di un grosso nucleo.

Il vitello fu risparmiato, ed a brevi intervalli ne fu esaminato il sangue, ma sempre con risultato negativo. Lo stesso giorno, il 4, furono inoculati col suo sangue un altro vitello ed una pecora: essi ammalarono in seguito di peste, ma non presentarono nè in circolo, nè negli organi, il parassita in parola.

La sera del 5 moriva il vitello numero 635; nè la tabella termografica, nè le manifestazioni cliniche, nè le lesioni anatomopatologiche presentarono fatti speciali,. all'infuori di quelle proprie della peste bovina. E l'esame microscopico accurato del sangue centrale, del fegato, della milza, del rene, del midollo delle ossa, del sistema linfatico escluse completamente la presenza del parassita o di forme sporogoniche.

Le circostanze nelle quali si svolse l'osservazione hanno fatto sì che noi non abbiamo potuto avere che quattro soli preparati, tre dei quali furono colorati con il bleu boracico, che comunemente adoperiamo, ed il quarto secondo il metodo Romanowsky lieve-

mente modificato tenendo i preparati per 24 ore a 37° C., cambiando un paio di volte il liquido colorante, e poi decolorando piuttosto fortemente.

In tutti e quattro i preparati, fatti con sangue periferico, non abbiamo potuto vedere che una diecina di individui del parassita in parola.

Esso si presenta libero (vedi Tavola III), di forma allungata, leggermente ricurva, uniforme; ha dimensioni variabili da 7 ai 10 μ e dall'1.6 ai 2 μ di larghezza. Le estremità sono arrotondate; un di esse qualche volta mostra un leggiero assottigliamento, con una strozzatura, e termina a punta smussa (vedi fig. 2 e 4).

Si colora benissimo col bleu boracico e con il Romanowsky. Le due colorazioni lasciano distinguere un corpo protoplasmatico piuttosto uniforme che si colora leggermente in bleu, con lieve accentuazione della colorazione ai due estremi. Si distingue anche un grosso nucleo allungato, posto sul mezzo del parassita, con estremi arrotondati od appuntiti, di dimensioni variabili, lungo da $^1/_2$ a $^2/_3$ dell'intero parassita, e largo da 1 a. 2 μ; qualche volta il nucleo può occupare quasi tutta la larghezza (vedi fig. 3).

Il contenuto nucleare, che col bleu boracico mostrasi piuttosto uniforme, col Romanowsky presentasi invece composto di distinti granuli cromatinici. Nello spessore del nucleo, piuttosto verso un margine, si scorge in certi individui (vedi fig. 1, 3, 4) come un diradamento della sostanza cromatica, tale da richiamare l'idea di un vacuolo.

In un individuo (vedi fig. 3ª) fu notata la presenza di granulazioni cromatiche (*cromidî* nel senso di Hertwig) situate ad un estremo, nella parte protoplasmatica, in vicinanza del nucleo.

Fu osservato anche un individuo, certamente in via di disfacimento (vedi fig. 6ª), che oltre al nucleo biforcato nel senso della lunghezza, presentava traccie della sostanza protoplasmatica.

Non furono riscontrati flagelli, nè filamenti cromatici, nè pigmento.

Il prof. Celli (6) d'accordo col Doflein divide gli SPOROZOA in: *Coccidioforma* e *Graegarinida.*

Il prof. Minclin (7) distingue il sottordine HAEMOSPOREA (dell'ordine *Haemosporidia*, Danilewsky) in tre generi:

I. *Lankesterella;*
II. *Karyolysus;*
III. *Haemogregarina*

basandosi principalmente sul rapporto in lunghezza tra parassita e globulo rosso.

Il prof. Laveran (8), tenendo conto di più fattori, divide gli HAEMATOCITOZOARII, o Ematozoarî endoglobulari, in tre generi:

I. *Haemamoaeba ;*

II. *Piroplasma ;*

III. *Haemogregarina.*

È alle *Gregarinida* di Doflein, al genere *Haemogregarina* di Minclin, *Haemogregarina* di Laveran, che noi crediamo, per i caratteri descritti, possa appartenere il parassita da noi riscontrato.

Infatti la sua forma allungata, leggermente ripiegata, il grosso nucleo allungato, l'assenza di flagelli e di pigmento, le granulazioni cromatiche sono caratteri propri del genere *Haemogregarina.*

Il paragone con le *Haemogregarina* già note sopra accennate riesce ancora più probativo.

L'*Haemogregarina Balfouri* ha più di un carattere in comune con quella da noi osservata; più specialmente intendiamo parlare della forma che Balfour chiama *trofozoito*, nel sangue. Così dicasi anche l'*Haemogregarina* di Christophers.

Noi non abbiamo potuto però, per quanto gli esami siano stati più che accurati, riscontrare le traccie di corpuscoli rossi attaccati al parassita, descritte dai due autori.

L'*Haemogregarina* di Bentley e James si allontanerebbe dalla nostra perchè attacca i leucociti; per quanto noi veramente non possiamo ora dire se la nostra sia parassita del corpuscolo rosso o dei leucociti, avendo riscontrato solo la forma libera e in iscarsi esemplari.

***

Crediamo che la nostra forma sia d'interesse speciale, perchè è la prima osservazione fatta di emogregarine nei bovini, ed è perciò che la chiamiamo HAEMOGREGARINA BOVIS.

Riguardo al suo modo di diffusione, per analogia, crediamo che ne siano agenti gli ectoparassiti. In verità noi li abbiamo cercati senza risultato sul vitello n. 635; ma ciò probabilmente per le regole di pulizia che sono abituali nelle nostre scuderie, appunto per evitare propagazione di parassiti.

In quanto alla sua azione patogena sul bue, essa è forse leggiera, come quella, ad esempio, che esercita lo spirillo sui buoi e sulle pecore. E noi crediamo che la sua scomparsa possa spiegarsi con le mutazioni indotte nel suo ambiente vitale dalla peste bovina, di cui era contemporaneamente affetto il vitello. E siamo confortati a pensare ciò da un fatto analogo che presenta il *Piroplasma bigeminum:*

noi molte volte nel sangue delle centinaia di vitelli produttori di *virus* che esaminiamo, abbiamo osservato (fatto già molto noto) lo svilupparsi, in forma or lieve or grave, della piroplasmosi: ma abbiamo anche alcune volte visto, specie nelle forme lievi, l'attenuarsi di questa infezione di mano in mano che la peste progrediva e più gravi si facevano le alterazioni del sangue, fino ad arrivare alla scomparsa completa del pirosoma.

E la forma della fig. 6ª, in via di disfacimento, ci sembra possa convalidare questo concetto.

Conclusione.

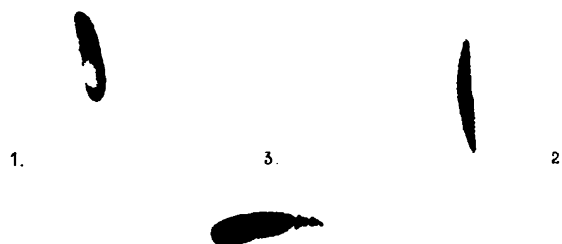
Alle *Haemogregarinae* dei mammiferi già note bisogna aggiungere l'HAEMOGREGARINA BOVIS.

Asmara, gennaio 1906.

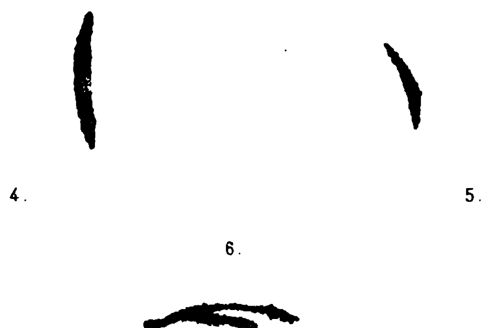
BIBLIOGRAFIA.

1. C. A. BENTLEY (Assam). *Preliminary note upon a leucocytozoon of the dog.* British medic. Journ. Maggio 1905.
2. S. P. JAMES (Simla, Inde). *On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs.* Scientific Memoirs by officers of the medic. a. sanit. departm. of the governm. of India. N. 14, 1905.
3. A. BALFOUR (Khartoum). *A Haemogregarina of Mammals,* H. jaculi (H. Balfouri, Laveran). British medic. Journ. Giugno 1905. Journ. of Trop. Med. Agosto 1905.
4. A. LAVERAN. *Sur une hémogrégarine des gerboises.* C. R. Sciences. Luglio 1905.
5. S. R. CHRISTOPHERS (Madras). *Haemogregarina gerbilli.* Scient. mem. by officers of the medic. a. sanit. departm. of the governm. of India. N. 18, 1905.
6. A. CELLI. *Manuale dell'Igienista.* Vol. I. Soc. Edit. D. Alighieri. Roma, 1904.
7. E. A. MINCLIN. *Class Sporozoa. A Treatise on Zoology.* Parte I, fasc. 2, 1903. Edito per E. Ray Lankester, Londres, Adam et Ch. Black.
8. A. LAVERAN. *Haemocitozoa. Essai de classification.* Bull. de l'Institut Pasteur. N. 20, 1905.

Colorazione col bleu boracico.



Colorazione col Romanowsky



Battisti lit.

Carpano dis.

0 2 4 6 8 10 μ

Istituto d'Igiene dell'Università di Roma

Etiologia dell'agalassia contagiosa delle pecore e capre

Memoria di A. CELLI e D. DE BLASI.

(Con le Tav. IV e V).

I. — Nozioni preliminari.

Da parecchio tempo si ricerca nel nostro Istituto la causa della agalassia contagiosa delle pecore e delle capre.

E' questa un'epizoozia diffusa nella campagna romana (1), e dagli allevatori, a sistema brado, del bestiame ovino e caprino assai temuta, pei forti danni economici che produce.

Sintomatologia.

Si manifesta più specialmente negli animali lattiferi con la diminuzione, fino alla scomparsa, temporanea o permanente del latte, onde il nome volgare di *asciuttarella* o *mal dell'asciutto* o *mal del secco.*

---

(1) Appunto nella campagna romana fin dal 1817 fu, per la prima volta, indicata sommariamente dal Metaxà, e poi dal dott. Dinella in Basilicata e Puglia nel 1862, nuovamente in Basilicata dal Provinzano nel 1863. Nel 1871 fu dal Brusasco descritta in Piemonte col suo vero nome di Agalassia contagiosa. In seguito fu descritta anche negli Abruzzi e nel Friuli, e denunziata in molte provincie d'Italia.

Ad es. nel decennio 1883-93 risultarono infette per ordine di intensità le provincie di Aquila, Roma, Caserta, Perugia, Basilicata, Macerata, Avellino, Benevento, Salerno, Cosenza, Teramo, Bari, Lecce, Ancona, Pesaro, Sondrio, Firenze.

Nel quinquennio 1901-905 furono ufficialmente denunziati casi 39,027 nel Lazio, e nelle provincie di Aquila 32,929, Macerata 15,535, Perugia 6,029, Potenza 2,533, Teramo 1,500, Foggia 1,104, Benevento 1,084, Ascoli Piceno 629, Campobasso 542, Avellino 488, Reggio Calabria 462, Porto Maurizio 327, Sassari 179, Cosenza 146, Torino 134, Caserta 105, Catanzaro 60, Massa-Carrara 50, Bari 9, Grosseto 5; in totale 103,240 casi, che notoriamente sono appena una parte di quelli in realtà verificatisi.

Secondo Zangger (1854) e meglio poi, secondo Hess e Guillebeau (1893) è un'epizoozia assai diffusa tra le capre di Svizzera, ove attualmente circa il 30% delle capre ne sono colpite con un danno economico rilevantissimo.

Con o senza reazione febbrile (40°-41°) le mammelle possono da principio mostrarsi uniformemente tumide e dolenti alla palpazione ed alla mungitura.

Il latte assume un aspetto caratteristico; diventa cioè di color turchiniccio, di consistenza o densa, come cremosa, od acquosa: nel primo caso si riduce subito di volume; nel secondo caso può ancora, per poco, essere più o meno abbondante, e viene a separarsi nettamente (Tav. IV, fig. 1) in una parte sierosa e in una parte di granuli o grumi, che aderiscono alle pareti del vaso e si raccolgono al fondo.

Ha sempre, inoltre, un sapore salato che è pure caratteristico (1).

Talvolta, già in primo tempo, con la mungitura esce un po' di sangue misto al latte specifico.

In secondo tempo, quando la secrezione lattea sta per cessare, le mammelle possono presentarsi indurite uniformemente o a noduli: e allora mungendo può uscire sangue insieme a poco latte cremoso od acquoso, ovvero soltanto una materia come purulenta e mista a residui di latte così denso da prendere, attraverso il capezzolo, la forma come di vermicelli.

Da ultimo, quando la secrezione lattea è cessata, le mammelle rimangono avvizzite.

Nei casi più leggieri può essere l'agalassia localizzata in una sola mammella; ed essere anche transitoria; come pure, dopo che furono colpite ambedue le mammelle, il latte può tornare più o meno presto e allora volgarmente la malattia prende il nome di *stornarella*.

In ogni modo, nell'anno successivo il latte può tornare alle due mammelle, ovvero ad una sola (e si hanno le cosiddette *pecore zenche*), ovvero, più raramente, non torna più (e si hanno le cosiddette *pecore tassate*).

Durante l'epizoozia e nell'anno seguente si hanno spesso aborti, natimorti e parti mostruosi: quand'anche gli agnelli nascono sani, non trovando latte, deperiscono.

Può la malattia *localizzarsi anche agli occhi*, con cheratiti parenchimatose, che, ulcerando la cornea, possono condurre alla panoftalmite, al vuotamento dell'occhio, e alla cecità, onde anche il nome volgare di *cecarella*.

E può anche *localizzarsi nelle articolazioni* (onde anche il nome di *zopparella*) con artriti, specialmente radiocarpiche, o multiple, cosicchè gli animali si vedono claudicare agli arti anteriori o posteriori, e nei casi più gravi giacciono atterrati.

Con queste alterazioni articolari e oculari si presenta appunto nei maschi e nelle femmine non lattifere, e solo eccezionalmente, senza cioè attaccare le mammelle, in quelle lattifere.

Però quand'anche la malattia è più generalizzata, e gli animali pur

---

(1) Chimicamente furono fatti alcuni saggi analitici. Il latte normale di pecore nostrane ha p. sp. = 1039-1041, grasso = 8-10 %.

Or bene nella pecora I (v. tab. 1 a pag. 284) trovammo di grasso 7,70 in una mammella e 13,50 % nell'altra, e nella pecora n. III (v. tabella 4 a pag. 287) trovammo una densità variabile di 1034.9-1035.7-1037.7-1040.1 e 5.40-6 % di grasso.

lungamente giacquero per terra a causa delle artriti, o perdettero la vista, a poco a poco si rimettono, e solo alcuni restano ciechi o zoppi, alcuni altri muoiono anche per altre lesioni (distoma, echinococco).

La *durata della malattia*, secondo la sua gravità, varia da pochi giorni a 1-2 mesi.

Anatomia patologica.

Ghiandole mammarie. — Ad occhio nudo e ad agalassia confermata, sono di volume più piccolo del normale, dure, e al taglio si vede molto sviluppato fra gli acini residuali, o al posto di questi, lo stroma del connettivo di nuova formazione.

L'esame anatomico microscopico dimostra un processo di *mastite interstiziale* (Tav. IV, fig. 3) caratterizzato da atrofia sino alla scomparsa del tessuto ghiandolare, con sostituzione di tessuto fibroso più o meno adulto, a seconda della durata della malattia.

La neoformazione connettivale non si limita solo nel parenchima ghiandolare perifericamente agli acini, ma si estende anche ai dotti interacinosi di medio e grande calibro, determinando in essi anche la formazione di *polipi fibrosi endo-canalicolari* (Tav. IV, fig. 2 e 3) rivestiti di epitelio, che in alcuni casi finiscono coll'obliterare completamente il lume dei tuboli. Tali formazioni si osservano specialmente nei casi non molto avanzati.

Questo processo di neoformazione connettivale endocanalicolare è paragonabile al processo di indurimento polmonare, nel quale è noto che si constata la formazione di polipi endobroncheolari ed endoalveolari.

Nei casi più avanzati (Tav. IV, fig. 4), oltre all'atrofia del parenchima ghiandolare, in seguito alla neoformazione connettivale, possono osservarsi anche alterazioni degenerative, come degenerazione calcarea, ecc.

Rare sono le suppurazioni o gli ascessi della mammella, consecutivi per lo più a ingorgo latteo, quando le pecore si abbandonano senza più mungerle.

Più rari sono gli ascessi periarticolari e intramuscolari.

Occhi. — S' incomincia con iperemia pericorneale e con diramazioni vascolari, che dal *limbus cornealis* si avanzano sulla cornea. Progredendo la malattia si ha cheratite parenchimatosa interstiziale con panno corneale (Tav. V, fig. 1).

All'esame microscopico (Tav. V, fig. 2) si nota infiltrazione parvicellulare e neoformazione vasale nello spessore della cornea.

Questo processo può risolversi, ovvero possono conseguire l'ulcerazione della cornea, lo stafiloma dell'iride, il vuotamento dell'occhio, la panoftalmite. Secondo questi diversi stadi, la malattia può guarire completamente, ovvero lasciare semplici leucomi, o cicatrici con cecità più o meno completa.

Articolazioni. — Si ha un' infiltrazione e un rigonfiamento più in ispecie del tessuto connettivo periarticolare. Questo al taglio si mostra ispessito e infiltrato di siero, mentre la sinoviale, la sinovia, le cartilagini appaion normali. Altre volte all'ispessimento del connettivo periarticolare si aggiungono : aumento di sinovia rossastra; ispessimento della sinoviale, talora (Tav. V, fig. 3) con qualche focolaio necrotico e infiltrazione parvi-

cellulare del tessuto connettivo circostante, e derosione delle cartilagini sottostanti; più raramente anche granulazioni endoarticolari fungose e come polipose di connettivo giovane. Per solito il processo si risolve con la ***restitutio ad integrum***; raramente permane un'anchilosi.

Specialmente nei tessuti articolari si nota anche un processo di endoarterite.

Epizoologia. — L'epizoozia si manifesta sotto due tipi; o, cioè, in forma acuta e rapidamente diffusibile a tutto il gregge, ovvero in forma cronica o sporadica: quest'ultimo tipo talora precede al primo: di solito però gli succede, e così un gregge, dopo un anno di epizoozia diffusa, può per 3-4 anni seguitare ad avere, ogni tanto, qualche caso fra le giovani madri.

Del resto, è un'epizoozia di tutti i luoghi e di tutte le stagioni. E' però più frequente a manifestarsi in autunno, quando comincia la mungitura, forse perchè allora si mette in evidenza il sintoma principale, l'agalassia, e gli animali si osservano più accuratamente, uno per uno.

Quando poi siasi sviluppata, se ne presentano più numerosi casi durante le stagioni piovose e in mezzo a greggi più denutriti per insufficienza di pascoli.

E' raro che con la nostra pastorizia brada un allevatore sfugga prima o poi alla temuta epizoozia. Le capre anzi ne sono molto più spesso affette e così la propagano più facilmente che le pecore.

Il *periodo d'incubazione* non potemmo, in natura, determinarlo con esattezza: alcuni lo fissano a poche ore (24-48 secondo Marra), altri a 20-30 giorni (Valdonio). Il Brusasco (1) sperimentalmente lo osservò di 6-12.

Ci risulta che in una masseria, cui si mescolò una pecora d'un vicino gregge infetto, si sviluppò dopo un mese l'agalassia.

Circa l'*immunità* si osserva che sempre, anche in un gregge molto infetto, rimangono animali naturalmente refrattari, in iscarso numero fra le femmine lattifere, in maggior numero fra le agnelle e i montoni; si deve però tener conto che in questi e in quelle la malattia appare dalle manifestazioni articolari e oculari, che nelle stesse pecore lattifere non sono costanti.

Nel corso d'una stessa epizoozia può rarissimamente esserne colpito anche due volte un animale ovino o caprino, ma la seconda volta in modo sempre più leggiero della prima.

Certo poi è che per 7-8 anni almeno perdura nel gregge un'immunità consecutiva all'epizoozia sofferta.

***

Notoriamente l'agalassia è molto contagiosa. Difatti perchè si sviluppi basta che un gregge venga a contatto, certe volte, anche mediante un solo animale, con un altro gregge infetto, o si corichi a dormire dove animali infetti si coricarono: da ciò viene anche il nome

---

(1) Il Medico Veterinario, 1871, e Trattato di patologia e terapia medica comparata, ecc. Dispensa 36ª. Torino, 1902.

volgare di *mal del sito*. I pastori temono e sfuggono anche i pascoli dove furono animali infetti, e sono pure convinti che il contagio si trasmetta con la mungitura, ed anche con la tosatura degli armenti (1).

Il Brusasco (2) confermò sperimentalmente che si trasmette con la mungitura. Altri zoojatri confermarono che si sviluppa in greggi sani dopo l'introduzione di capre o pecore malate.

Ma il prof. Oreste (3) nel 1882, 1884 e 1885 sperimentando su pochissimi animali non riuscì a trasmetterla con l'innesto nè del latte (a due sole pecore), nè del sangue e del muco nasale, e nemmeno con la coabitazione, tantochè affermò, senz'altro, trattarsi di un'enzoozia destituita di potere contagioso.

Anche il dott. L. Valentini (4) nel 1889-90 non riuscì a propagare la malattia nè facendo coabitare animali sani cogli affetti, e neppure inoculando a due pecore sane nei canali galattofori il latte infetto, e sotto cute a montoni ed agnelle la sinovia e l'umor acqueo degli ovini malati di poliartriti e cheratiti (5).

Invece il dott. Marra (6), inoculando pus o latte infetto nei capezzoli e sotto cute nella parte interna delle coscie a ovini avrebbe riprodotta la malattia in 24-48 ore; mentre Hess e Guillebeau (7) non riuscirono a riprodurla nè colla coabitazione, nè iniettando il latte di bestie malate nelle mammelle e il pus sotto cute di capre sane.

Celli e Santori però nel 1896-97 riprodussero due volte l'agalassia, inoculando sotto cute nei pressi delle mammelle di pecore sane il latte sieroso caratteristico, e preso all'inizio della malattia: in un caso oltre l'agalassia ottennero sperimentalmente anche le artrosinoviti e le cheratiti. Le iniezioni invece di sinovia e di umor acqueo, nonchè di latte di animali da tempo malati, ebbero un risultato negativo.

Le esperienze positive dei suddetti autori confermavano indubbiamente la convinzione popolare della contagiosità dell'agalassia, messa in dubbio con troppo scarse esperienze.

---

(1) Fanno cambiare gli abiti ai cosiddetti *carosatori*, quando hanno prima tosato animali agalassici.

(2) Loc. cit.

(3) Bullettino delle notizie agrarie, 1882. — Malattia del bestiame ovino della provincia di Aquila; e 1886 — Sulla pretesa contagiosità della Stornarella o Asciuttarella.

Annali di Agricoltura, 1896. Atti della Commissione per le malattie degli animali.

(4) Comunicazione al Collegio dei zoojatri in Roma. Tornata del 24 marzo 1903.

(5) Più minute particolarità delle esperienze fatte non sono ricordate nella nota succitata.

(6) Moderno Zoojatro — Agalassia contagiosa, ecc., vol. II, 1891.

(7) Landwirtschaftliches Jahrbuch, vol. VII, 1893.

II. — Etiologia.

Si ricorse prima, e successivamente più volte, alla batteriologia, ma sempre senz'alcun risultato.

Così il prof. Oreste (1), insieme col Marcone' isolò e coltivò dal latte malato alcuni micrococchi, coi quali però non riuscì a riprodurre la caratteristica agalassia.

Secondo il dott. Valentini (2) lo stesso prof. Bizzozero fece indagini microscopiche sui prodotti morbosi e sui tessuti di animali infetti di agalassia nelle sue diverse forme, senza però alcun risultato positivo.

Altrettanto negativi furono i tentativi di coltura in ogni terreno nutritizio allora (1889-90) conosciuto e sperimentato.

Successivamente anche Celli e Santori con le comuni indagini batteriologiche, comunque fatte e ripetute e variate, nel sangue, nel latte, nel succo delle mammelle, nei prodotti morbosi delle articolazioni e degli occhi non riuscirono a mettere in evidenza alcun germe speciale, e nessuno dei vari germi coltivati e isolati poteron dire caratteristico, o capace di riprodurre sperimentalmente la malattia.

Con tutto ciò, durante il corso delle nostre esperienze, che ora esporremo, abbiam fatto altri *tentativi per colorare e coltivare l'agente etiologico dell'agalassia.*

Delle colorazioni adoperammo anche quelle pei protozoi (Romanowski, Giemsa, Marino) e quelle per le ciglia dei batteri, oltre alle colorazioni vitali col turchino di cresile, ma sempre infruttuosamente.

Per le colture adoperammo terreni preparati con materiale affine più che fosse possibile a quello nel quale il germe si trova o si suppone trovarsi negli animali spontaneamente infetti. Abbiamo quindi seminato ripetutamente il latte filtrato in terreni liquidi, riconosciuti sterili dopo una permanenza di una settimana in termostato, e fatti di siero di latte, di latte di pecora, di capra, di vacca, privato dei globuli del grasso e sterilizzati per filtrazione attraverso grandi filtri Reichel-Maassen, di siero di sangue di pecora o di capra intero o allungato a parti eguali con brodo nutritivo. I tubi, messi parte a 22° C e parte a 37° C, parte in aerobiosi e parte in anaerobiosi, non mostrarono mai sviluppo di alcun germe, nè al microscopio si riuscì a rivelrarne. Invano fu anche tentata la coltura in sacchetti di collodion lasciati per qualche settimana nel peritoneo del coniglio.

Abbiamo perciò battuto un'altra via, tentando *dimostrare se il virus dell'agalassia non fosse di quelli filtrabili ed ultramicroscopici.*

E già con le prime esperienze eseguite nella primavera del 1904 (3) potemmo riprodurre il sintomo principale, l'agalassia, inoculando a una pecora il filtrato, batteriologicamente sterile, del latte caratteri-

---

(1) Loc. cit. Annali di agricoltura.
(2) Loc. cit.
(3) Clinica Veterinaria, anno XXVII, maggio 1904.

stico, e da questa pecora, con lo stesso procedimento, trasmettemmo l'agalassia a una seconda.

Con ulteriori esperienze proseguite nel 1905 oltre a confermare le prime potemmo riprodurre e dimostrare al Congresso dei patologi, nell'aprile in Roma (1), anche l'altro sintomo caratteristico, la cheratite parenchimatosa.

E finalmente, con le ultime esperienze di quest'anno 1906, riproducemmo sperimentalmente anche l'artrite, oltrechè il quadro completo della malattia.

Crediamo perciò sia ora di far conoscere nei loro più interessanti particolari le nostre esperienze.

III. — Tecnica (2).

a) Preparazione dei filtrati. — Nella prima esperienza adoprammo un filtro Berkefeld nuovo; nelle successive sempre filtri Silberschmidt, la porosità dei quali ci parve non differire gran che da quella delle ordinarie Berkefeld. Tuttavia considerando che, fra tante esperienze fatte, il numero dei risultati negativi non fu scarso, dobbiamo pensare che l'agente etiologico dell'infezione non sia tanto piccolo da passare sempre attraverso candele che abbiano la porosità delle Silberschmidt.

Il latte malato veniva prima agitato con bacchette di vetro per rimescolarne bene gli elementi e soprattutto per disgregare in quanto fosse possibile, senza usare sostanze chimiche, i grumi caratteristici. Una prima filtrazione veniva fatta attraverso carta bibula per una o due volte successive.

Le candele, prima di essere adoperate, venivano sottoposte ad una prova preliminare fatta per assicurarsi sopra tutto della mancanza di fenditure interne più o meno sottili, e consistente nelle insufflazioni di aria, mediante una pera Centanni, nell'interno dei filtri tenuti immersi in acqua: se esercitando una pressione piuttosto forte con la mano non si vedono gorgogliare bollicine d'aria dalla superficie esterna della candela, o se sono bollicine finissime, la candela può essere adoperata.

Furono usati sempre filtri nuovi per ogni esperienza, la qual precauzione può sembrare eccessiva, ma è certamente utile per la sicurezza e la speditezza delle esperienze. Riconosciuta adatta una candela, veniva sterilizzata in autoclave.

Il latte, già prima filtrato per carta bibula, veniva diluito, se occorreva, col doppio, col triplo, col quadruplo di soluzione di $NaCl$ al 0.85 %, si aggiungeva ad esso per controllo una emulsione abbondante di colture su agar di 24 ore di b. prodigioso e di b. fluorescente e si filtrava sotto una aspirazione di circa mm. 700-730 di Hg, prodotta da una tromba a

(1) Lo Sperimentale, anno LIX, fasc. V, settembre-ottobre 1905.
(2) Tutta la parte tecnica di questo lavoro spetta al dott. De Blasi.

caduta d'acqua, per una durata variabile da 1/4 di ora ad un'ora. Il filtrato veniva raccolto in pipette del Roux sterili e conservato nel refrigerante alla temperatura di 12-14° C fino al momento dell'inoculazione. Di ciascun filtrato si allestivano colture di controllo in brodo comune e su agar che venivano tenute parte a 22° C, parte a 37° C, per la durata di 7-15 giorni. Se in nessuno dei tubi tenuti in termostato si sviluppavano il prodigioso o il fluorescente, od altro germe che fosse eventualmente passato dal latte, il filtrato veniva riconosciuto adatto all'esperimento. In generale però, se il filtrato è inquinato, si dimostra tale già nelle prime 24-48 ore. E di filtrati inquinati ne abbiamo avuti qualche volta, nonostante le precauzioni cui abbiamo più sopra accennato.

Occorrendo tale inconveniente, il materiale veniva naturalmente scartato o assoggettato a nuova filtrazione.

Nei preparati a fresco e nei preparati colorati con vari metodi, non riuscì mai di vedere alcun che di notevole, adoperando i comuni metodi di osservazione microscopica. Simili preparati furono allestiti, con risultato anche negativo, dai filtrati conservati nel refrigerante anche per alcune settimane.

b) Inoculazione nelle mammelle. — Fu fatta dapprima nel parenchima, penetrando con la siringa nella mammella dal suo lato esterno, osservando le regole dell'antisepsi e dell'asepsi. Altre volte fu adoperato un metodo, diciamo così, incruento; in una pipetta Pasteur sterile fu aspirato il filtrato da inoculare (1-2 cmc.), e poi la punta della pipetta fu introdotta nel condotto galattoforo cautamente fino a sentire la resistenza del parenchima: allora si dava qualche punzecchiatura sul parenchima colla punta della pipetta e poi si lasciava andare il liquido nel condotto galattoforo. Estratta la pipetta, il capezzolo veniva tenuto stretto per una mezz'ora circa, durante la quale si esercitava un moderato massaggio sulla mammella. Specialmente con questo metodo d'inoculazione si ebbero *esiti positivi*, come vedremo.

c) Inoculazione negli occhi. — Sulle prime fu tentato di trasmettere l'affezione oculare scarificando le cornee, tanto delle pecore quanto dei conigli; fu anche tentato di applicare batuffoli di ovatta sterili imbevuti del filtrato e tenuti a contatto colla cornea per 12-24 ore mediante sutura delle palpebre: ma nessuno di questi due metodi ebbe esito positivo, giacchè tranne un opacamento più o meno diffuso delle cornee, che si dileguava in 3-4 giorni, e che del resto si produceva anche usando filtrato di latte di animali sani, non fu osservato altro.

Le inoculazioni nella camera anteriore invece si dimostrarono fin dalle prime esperienze molto adatte allo scopo. Vennero sempre fatte con siringhe Pravaz, in corrispondenza del margine corneale, e precisamente del suo contorno superiore, previo trattamento con soluzione di sublimato all'1 per 5000 e lavaggio con soluzione fisiologica sterile: si lasciava prima fluire dall'ago introdotto qualche goccia di umore acqueo e poi si inoculava il liquido (5 a 10 gocce in media).

d) Inoculazione nelle articolazioni. — Venne fatta nelle articolazioni anteriore (del carpo) e posteriore (del tarso), dopo avere ben rasi i peli

e disinfettata la cute. Il liquido veniva spinto soltanto quando si aveva netta la sensazione dell'ago penetrato nella cavità articolare.

e) Governo degli animali in esperimento. — Quanto all'alimentazione, si è cercato tenere gli animali nelle condizioni più favorevoli e più prossime alle naturali; anzi spesso furono tenuti a pascolo in un prato, rimanendo però separati l'uno dall'altro per modo che ogni pecora avesse a sua disposizione un ampio quadrato di terra, e sempre quello. La mungitura fu affidata a diverse persone, ed ogni pecora era munta sempre dalla stessa persona; nei casi d'inoculazione in una mammella, si mungeva prima sempre la mammella inoculata.

IV. — Prima serie di ricerche.

Riproduzione sperimentale dell'agalassia.

Esperimento 1° - *Pecora I.* — Circa 20 cmc. di latte caratteristico per il sapore salato e per la separazione in coagulo e siero furono raccolti il 26 aprile 1904 da una *pecora* malata. Il giorno appresso il latte fu copiosamente inquinato col b. prodigioso e filtrato attraverso candele finamente porose, la cui integrità era stata precedentemente accertata. Il 1° maggio essendo rimasti perfettamente sterili i vari terreni di coltura seminati con parecchie gocce di filtrato, questo fu inoculato in una pecora lattifera sana, tolta da gregge sano. Osservammo scrupolosamente l'asepsi ed altre cautele per evitare il contagio a mezzo dell'operatore. E precisamente inoculammo:

3 cmc. nel parenchima della mammella sinistra;
2 cmc. sotto la cute della mammella destra.

L'osservazione della pecora fu cominciata il 27 aprile, cioè 4 giorni prima dell'inoculazione: da quel giorno, mattina e sera, fu munto quotidianamente il latte e si misurò separatamente la quantità fornita da ciascuna mammella.

Diamo in fine (v. pag. 284) la tab. 1 che mette sott'occhio le indicazioni quantitative e qualitative del latte prima e dopo l'inoculazione.

Esperimento 2° - *Pecora I.* — Il 4 maggio avemmo dell'altro latte caratteristico di *capra* malata; lo filtrammo nelle condizioni accennate; il liquido ottenuto (2 cmc.), dopo essere stato riconosciuto sterile colle prove culturali, fu inoculato il 7 maggio nella stessa pecora, nel parenchima della mammella destra, che aveva dato sempre latte normale per quantità e qualità, e fu continuata l'osservazione giornaliera, come risulta a pag. 285 dalla tab. 2, ch'è il seguito della precedente.

Il giorno 12 furono osservati degli indurimenti nel parenchima ghiandolare della mammella destra, che durarono per i tre giorni successivi e poi si risolsero gradatamente.

La pecora non ha presentato quasi mai elevazioni febbrili nè abbattimento o malessere.

Esperimento 3° - *Pecora II.* — Il *latte caratteristico ottenuto dalla mammella destra della pecora dell'esperimento 2°*, nei giorni 9 e 10, fu filtrato alla sua volta, e dopo l'accertamento della sterilità del liquido ottenuto, questo fu inoculato in un'altra pecora lattifera, sana, proveniente da un gregge sano: questa pecora fu messa in luogo lontano dalla prima e non è stata mai neppure avvicinata dalle persone che avevano avuto contatto diretto o ndiretto colla prima pecora. L'inoculazione fu fatta con 2 cmc. di filtrato l giorno 13 nel parenchima della mammella destra.

Vedi in fine, a pag. 286, la tab. 3 riguardante questo esperimento.

La mungitura fa fatta costantemente prima dalla mammella sinistra e poi dalla destra. La pecora ha avuto anche qualche leggera elevazione termica (40, 5-41° C.) e ha presentato un grave stato di abbattimento dal 14 al 16: dal 16 in poi si è venuta rimettendo.

Cosicchè, dunque, *col filtrato del latte caratteristico della 1ª pecora si è riprodotta la agalassia in una seconda pecora.*

Esperimento 4° - *Pecora III.* — Premeva di vedere se il filtrato della pecora II artificialmente infettata fosse capace di infettare un'altra pecora.

Perciò il 3 giugno 1904 una pecora sana lattifera, proveniente da gregge non infetto, fu presa e tenuta in osservazione durante parecchi giorni, e poi inoculata col filtrato del latte caratteristico fornito dalla pecora II. Come appare dalla tab. 4 (v. a pag. 287) nelle mammelle di questa pecora, prima dell'inoculazione del materiale virulento filtrato, fu iniettato latte filtrato sterile di pecora sana e siero di latte di vacca, per assicurarsi della innocuità dei costituenti normali del latte filtrato.

Dalla tabella 4 si vede che l'*inoculazione di circa 2 cmc. di latte di pecora sana filtrato o di siero di latte di vacca nel parenchima mammario provoca una diminuzione del latte solo per qualche giorno, ma non produce alcuna alterazione caratteristica. Per contrario l'inoculazione del filtrato della pecora II ha prodotto non solo una diminuzione notevole e più duratura del latte, ma questo si è mostrato caratteristicamente alterato.* E' però da avvertire che il latte non si alterò sensibilmente nella mammella non inoculata, e che, dopo un paio di settimane, il latte della mammella inoculata ritornò quasi normale.

L'*esame anatomico ed istologico* delle mammelle delle precedenti tre pecore dimostrò trattarsi essenzialmente di un processo di mastite interstiziale cronica, con ipertrofia del connettivo, e nei casi 1 e 2 come nel caso 3 anche con neoformazione di quei polipi endocanalicolari caratteristici, che sono stati descritti avanti: nel 2° caso di polipi non ne furono rinvenuti. E' importante il reperto istologico positivo nel 3° caso, giacchè esso ci permette di osservare che la pecora inoculata in 3° passaggio contrasse realmente l'infezione, benchè leggiera, come appare dal corrispondente protocollo.

Che nel 2° caso non siasi osservata neoformazione di polipi non deve recar meraviglia, giacchè quando il processo di atrofia è più avanzato (v. più oltre Esperimento 5°) non se ne riscontrano.

Dunque, tanto per il decorso clinico e per le modificazioni del latte quanto per il reperto istologico, queste tre esperienze provano che *il*

filtrato del latte malato provoca in tre passaggi successivi l'infezione, e quindi ne contiene il virus: ma considerando che il 3° animale inoculato presentò una forma piuttosto leggera, si può pensare se esso non *si attenui già dopo tre passaggi* (1).

ESPERIMENTO 5° - *Capra I.* — Fin qui le esperienze furono fatte sulle pecore; ma è noto che anche le capre ammalano di agalassia, e però importava di esperimentare anche in questi animali.

A tal uopo il 18 giugno 1904 fu raccolto da parecchie pecore malate del latte caratteristico, che fu filtrato il 20 giugno 1904 e conservato al buio in refrigerante alla temperatura di circa 12-14' centigradi. Il 5 settembre il filtrato, rimasto sterile, fu inoculato nel parenchima mammario di una capra napoletana lattifera sana, cortesemente ospitata nella Scuola veterinaria di Napoli. La capra ammalò, dopo un periodo d'incubazione di circa una settimana, in modo tipico: la quantità del latte diminuì notevolmente da tutt'e due le mammelle; in principio il latte della mammella inoculata aveva aspetto cremoso, quello dell'altra mammella aspetto sieroso, ma gradatamente prese aspetto acquoso anche il latte della mammella inoculata; la produzione del latte cessò da ultimo completamente.

L'esame istologico delle mammelle di questa capra dimostrò una mastite interstiziale cronica, con retrazione del connettivo e degenerazione calcarea di molti elementi, ma senza neoformazione di polipi.

Lo stesso filtrato, che produsse la malattia nella capra, inoculato nel parenchima mammario di due pecore sane lattifere il 26 ottobre 1904, e in una terza pecora il 7 gennaio 1905, si dimostrò sfornito di proprietà infettanti. Sicchè il virus da noi adoperato *si conservò attivo certamente per lo spazio di circa due mesi e mezzo, divenne inattivo in poco più di tre mesi.*

***

Durante la primavera del 1905, essendosi l'epizoozia propagata a più branchi di ovini nella Campagna, si potè ottenere nuovo materiale, cioè *latte malato*, come per brevità si dirà d'ora innanzi. e si fecero le seguenti esperienze:

ESPERIMENTO 6' - *Pecora IV.* — In una pecora sana lattifera entrata nell'Istituto il 29 marzo e tenuta in osservazione per 5 giorni, durante i quali forniva in media da ciascuna mammella 30-40 cmc. al giorno, furono inoculati 2 cmc. di filtrato di latte malato raccolto di recente da un gregge infetto nella tenuta di Salone. Il latte diminuì repentinamente in tutt'e due le mammelle, divenne molto denso nei primi giorni, e poi diminuendo sempre, fino a ridursi a poche gocce, si fece sieroso, con numerosi gru-

(1) Un fatto analogo venne riscontrato dal Loeffler, al quale non riuscì di conservare attivo il virus dell'afta epizootica per più di tre o quattro passaggi nel porco o nel vitello.

metti sospesi. Il latte dopo alcuni brevi periodi, nei quali alternativamente scompariva e ricompariva in quantità di pochissime gocce, scomparve da ultimo in maniera definitiva. Dopo circa un mese, spremendo le mammelle, si ottenne ancora qualche goccia di un liquido sieroso per alcuni pochi giorni.

Vedi a pag. 289 il protocollo di questa esperienza nella tab. 5.

Questa esperienza ebbe dunque esito positivo, e però *conferma i risultati già precedentemente ottenuti con materiale di altre provenienze.*

Esperimento 7° - *Pecora V.* — Il latte raccolto dalla pecora precedente, filtrato nelle solite condizioni, fu inoculato il giorno 16 maggio nel condotto galattoforo della mammella destra di una pecora sana lattifera, già prima tenuta in osservazione per 9 giorni, durante i quali forniva da ciascuna mammella circa 90-120 cmc. di latte al giorno.

Come appare dalla tab. 6 (v. pag. 291) il latte diminuì in modo repentino, acquistando i caratteri del latte malato.

L'emigrazione estiva dei greggi dalla campagna romana all'Appennino non permise di continuare la serie: ma in ogni modo *la trasmissione per altri due passaggi successivi conferma il risultato delle prime esperienze* esposte, e la conferma è tanto più valida in quanto anche nelle mammelle di queste due pecore furono trovate le note anatomiche di una mastite interstiziale, con ipertrofia del connettivo nella prima pecora, con retrazione del medesimo nella seconda.

***

Sulla fine del 1905 l'epizoozia si riaccese nella stessa mandria di Santa Marinella, che ci aveva fornito materiale di studio nella primavera scorsa.

Ne profittammo per ripetere l'esperienza di riprodurre l'agalassia sperimentale; ed eccone il risultato:

Esperimento 8° - *Pecora VI.* — Il 18 dicembre 1905, poco dopo la ricomparsa dell'epizoozia, fu raccolto del latte malato, che fu prima filtrato per carta bibula, poi per candele Berkefeld e da ultimo per candele Silberschmidt, previa aggiunta del controllo.

Il filtrato si dimostrò perfettamente sterile e fu conservato in refrigerante fino al momento del bisogno.

Il 22 dicembre entrò nell' Istituto una pecora sana lattifera, che fu tenuta in osservazione per 6 giorni, dopo i quali fu inoculata, incruentemente, nel canale galattoforo della mammella destra con 4 cmc. di latte filtrato e sul capezzolo corrispondente, mediante punzecchiature e instillazioni, con circa $^1/_2$ cmc. dello stesso filtrato.

Come si vede dalla tab. 7 a pag. 293 nei primi quattro giorni il latte diminuì notevolmente nella mammella inoculata, senza però mostrarsi alte-

rato, mentre l'altra mammella continuò a dare una quantità di latte press'a poco uguale a quella di prima. Dopo 5 giorni il latte a destra presentò fini grumetti, e nei giorni successivi, scemando rapidamente di quantità, divenne nettamente sieroso e salato. Durante questo tempo la mammella sinistra fornì latte normale per qualità e quantità. Il 5 gennaio, la mattina e la sera, la mungitura fu fatta prima dalla mammella malata e poi dalla sana, per vedere se fosse trasportabile in questa guisa il virus. Il giorno dopo non si notò alcuna alterazione, ma dopo due giorni anche la mammella destra fornì latte in quantità molto minore e di aspetto sieroso caratteristico. D'allora in poi il latte di ambedue le mammelle si è ridotto a poche gocce caratteristicamente sierose, e poi è cessato.

Il 26 gennaio si cominciò ad osservare un opacamento circoscritto della cornea destra, il quale si fece nei giorni successivi più intenso, mentre si venivano neoformando dei vasi in corrispondenza del *limbus cornealis*. Il 1° febbraio si osservò nella zona più fortemente infiltrata una erosione epiteliale (v. Tav. V fig. 1), che divenne in breve una vera ulcerazione, circondata da un alone rosso vivo. Però non si è avuta perforazione, anzi la lesione, dopo essere stata per alcuni giorni stazionaria, è andata in regressione, residuandone un leucoma.

Riassunto delle precedenti esperienze riuscite positive.

Col latte agalassico filtrato attraverso Berkefeld siamo riusciti a riprodurre sperimentalmente l'agalassia in una pecora, e col latte filtrato attraverso Silberschmidt in 6 pecore e 1 capra. Basta, per riprodurla, inoculare nei capezzoli il virus filtrato o introdurlo nei condotti galattofori, talora anche entro il parenchima della mammella; e con qualunque di questi modi d'inocularlo la durata dell'incubazione varia da 5 a 6 giorni.

Vedremo che per riprodurre l'agalassia basta eziandio inocularlo sotto cute e nelle articolazioni, e, talora. anche strofinarlo sui capezzoli.

La agalassia può limitarsi alla sola mammella inoculata, ovvero diffondersi anche all'altra; e come in natura può essere transitoria o permanente.

In un caso (pecora VI) oltre l'agalassia s'è sviluppata anche una tipica cheratite parenchimatosa interstiziale, della cui riproduzione sperimentale tratteremo più sotto.

Il virus di pecora e quello di capra, sperimentalmente, non si differenziano nella loro azione patogena.

Da animale ad animale non arrivammo a trasmetterlo più in là del 3° passaggio. Così pure si attenuò e in circa 3 mesi finì col perdersi sebbene si conservasse a media temperatura costante (15° C) e all'oscuro.

Presenta dunque quella facile labilità che è propria di altri virus filtrabili.

L'inoculazione, anche intramammaria, di ogni altro svariato materiale può dare una transitoria cessazione del latte, ma non riproduce mai l'agalassia.

ESPERIENZE NEGATIVE.

I. In una capra sana, proveniente da Terracina, entrata nell'Istituto il giorno 14 marzo 1905 e tenuta in osservazione per tre giorni, durante i quali forniva da ciascuna mammella circa 152 206 cmc. di latte al giorno, fu inoculato anzitutto il filtrato sterile di latte di capra sana nel parenchima della mammella sinistra; e dopo due giorni, visto che la detta inoculazione non aveva prodotto alcuna alterazione, fu inoculato nel parenchima della mammella destra il filtrato del latte di una pecora spontaneamente ammalata di agalassia.

Ma nessuna alterazione, e neppure diminuzione notevole di latte fu notata in conseguenza della inoculazione.

II. In una pecora sana lattifera, entrata nell'Istituto il 20 marzo 1905 e tenuta in osservazione per tre giorni, durante i quali forniva 70-80 cmc. di latte da ciascuna mammella, furono inoculati, il 23 marzo, nel parenchima della mammella destra cmc. 2 ½ di filtrato di un latte caratteristico di recente raccolto da pecore malate nella tenuta di Santa Marinella. Per circa 7 giorni subito dopo l'inoculazione, mentre il latte munto dalla mammella sinistra era normale per quantità e qualità, quello fornito dalla mammella destra era denso, sanguinolento e scemato al sesto della quantità primitiva. Ma dopo una settimana il latte ritornò normale, e così restò fino all'8 aprile, nel qual giorno si inocularono nel parenchima sinistro 2 cmc. di filtrato di latte alterato raccolto da alcune pecore di un gregge infetto nella tenuta di Salone. L'esito di questa seconda inoculazione fu pure negativo, sicchè dopo circa una settimana il latte ritornò normale per quantità e qualità.

III. In una pecora sana lattifera, entrata nell'Istituto il 20 marzo 1905 e tenuta in osservazione per tre giorni, durante i quali produceva 45-60 cmc. di latte per ciascuna mammella, furono inoculati, il 23 marzo, nella giugulare destra cmc. 2 ½ dello stesso filtrato usato nella prima inoculazione alla pecora precedente. Il latte non mutò i suoi caratteri normali e non diminuì repentinamente in modo notevole; ma in capo a circa un mese e mezzo, dopo una graduale diminuzione, scomparve del tutto, conservando però fino all'ultimo il suo aspetto normale.

IV. In una pecora sana lattifera, entrata nell'Istituto il 29 marzo 1905, e tenuta in osservazione per sei giorni, durante i quali dava circa 120-200 cmc. per ciascuna mammella, furono inoculati il 3 aprile, nel parenchima della mammella destra, cmc. 2 ½ di filtrato di latte malato raccolto da parecchie pecore malate nella tenuta di Santa Marinella. Il latte non diminuì sensibilmente; solo apparve nei primi due giorni sanguinolento, ma poi ridiventò normale. Il 10 aprile nel parenchima della mammella sinistra della stessa pecora furono inoculati cmc. 2 ½ di filtrato di latte malato raccolto a Salone: ma neanche dopo questa inoculazione furono osservati mutamenti degni di nota nel latte fornito dalle due mammelle.

V. Collo stesso materiale adoperato per l'esperienza della pecora V (Esperimento 7°) ma filtrato per altra candela, fu inoculata nel condotto galattoforo della mammella sinistra il 10 maggio 1905, dopo tre giorni di osservazione, un'altra pecora che dava circa 30-35 cmc. al giorno da ciascuna mammella: ma non si osservò alterazione di sorta.

VI. Una pecora sana lattifera fu inoculata nel condotto galattoforo della mammella destra, il 20 maggio 1905, con cmc. 2 ½ di filtrato di latte raccolto da pecore malate nella tenuta di Cognettaro (Caprarola). Esito negativo.

VII. Altra pecora sana lattifera fu inoculata come la precedente il 20 maggio 1905 con cmc. 2 di filtrato di latte malato, raccolto nella tenuta Aldobrandini (Caprarola). Esito negativo.

Riassunto delle precedenti esperienze riuscite negative.

Nel parenchima delle mammelle o nei condotti galattofori o nelle vene inoculando virus (rispettivamente latte) filtrato di animali agalassici, non si riprodusse la malattia in 6 pecore e 1 capra.

Però, si noti, il virus proveniva talvolta da epizoozie lievi (esperienze II e IV) o vecchie (esperienze II e VII); altre volte era scarso e quindi per filtrarlo si dovette diluirlo (esperienze I e V); una volta s'inoculò nella giugulare (esperienza III), e tre volte (esperienze I, II e IV) nel parenchima ghiandolare, che non è la via più sicura (v. in seguito Esperimento 11°); oltrechè non si potè mai escludere una qualche immunità naturale, non rara anche in mezzo a gravi epizoozie.

Si aggiunga che pure col latte, specie se di animali da lungo tempo malati, non sempre si riproduce la malattia, e che eziandio inoculando altri virus filtrabili (rabbia) si hanno spesso risultati negativi.

Si può, quindi, con certezza asseverare che le precedenti esperienze negative non possono menomare il valore di quelle riuscite indubbiamente positive già nella prima serie, dianzi esposta.

V. — Seconda serie di ricerche.

Riproduzione sperimentale delle alterazioni oculari.

Fra i vari animali inoculati nella mammella, tenuti in esame anche per alcuni mesi, solo nell'ultima pecora VI (Esperimento 8°) osservammo la cheratite caratteristica che non di rado accompagna la infezione spontanea. Però tentammo e riuscimmo anche a *riprodurre la malattia oculare mediante la inoculazione diretta del virus filtrato tanto nelle pecore e nelle capre quanto nei conigli.*

Esponiamo queste esperienze riuscite positive.

I. Il filtrato sterile del latte malato fornito dalla pecora IV (Esperimento 6°) s'inocula, nella quantità di 8-10 gocce, nella camera anteriore dell'occhio destro di una pecora sana lattifera.

Subito dopo l'inoculazione la tensione dell'occhio è aumentata e appare un leggiero opacamento biancastro della cornea.

Nei primi 5 giorni successivi alla inoculazione non si notano fatti degni di nota; ma dal 5° giorno in poi si osservano delle neoformazioni vasali che lentamente ma continuamente procedono dal *limbus cornealis* verso la parte centrale della cornea stessa, sicchè dopo 15 giorni le alterazioni macroscopiche riscontrate nell'occhio possono così brevemente riassumersi:

La congiuntiva palpebrale e bulbare appare iperemica e leggermente chemotica. Dall'alto del *limbus* si diparte un fascio di vasi che invade la cornea fino al suo terzo superiore; questa neoformazione interessa lo strato compreso fra l'epitelio e la capsula del Bowman. I rami terminali dei vasi si suddividono finissimamente in modo da simulare quasi una suffusione o

spandimento sanguigno in questa membrana. Al di sotto di questa regione si nota una infiltrazione profonda della cornea, estesa per circa 3-4 millimetri. La cornea mostrasi uniformemente opaca. L'occhio è dolente alla pressione.

L'occhio malato fu enucleato 18 giorni dopo l'inoculazione, e messo in capsula Petri sterile; se ne raccolse l'umor acqueo e la cornea e si usarono per successive inoculazioni. L'umor acqueo fu diluito col doppio volume di soluzione fisiologica; la cornea fu spezzettata e triturata a lungo con soluzione fisiologica in mortaio di vetro sterilizzato.

II. Circa 10-12 goccie della soluzione di umor acqueo furono inoculate nella camera anteriore dell'occhio sinistro di una pecora sana lattifera, ed altrettante gocce dell'emulsione, contenente un po' di detrito corneale, nell'occhio destro.

In ambo gli occhi cominciarono ad apparire gradatamente, ma con evoluzione alquanto più rapida che nella pecora precedente, le stesse alterazioni già descritte; la neoformazione vasale fu più abbondante e nell'occhio destro, in corrispondenza del quadrante infero-interno, in posizione paracentrale (e quindi lontana dal punto d'inoculazione), si produsse, dall'ottavo giorno, una infiltrazione diffusa profonda, di forma quasi triangolare, che metteva capo nel suo vertice ad una ulcerazione, interessante oltre gli strati profondi anche gli strati superficiali, con assottigliamento di tutti i tessuti e con tendenza alla perforazione. E infatti dopo altri due giorni la cornea si perforò e avvenne un parziale votamento del bulbo.

L'enucleazione dell'occhio sinistro, alterato anch'esso in modo tipico, ma non ulcerato, fu fatta 14 giorni dopo l'inoculazione. Per l'esame microscopico v. Tav. V fig. 2.

III. L'umor acqueo dell'occhio enucleato della pecora precedente si allunga circa al doppio con soluzione fisiologica, e s'inocula nell'occhio sinistro di una terza pecora. Risultato positivo anche in questa.

Il virus dunque, filtrato e inoculato prima nella mammella di una pecora (la IV) *ha riprodotto la agalassia caratteristica; il latte di questa pecora, filtrato, ha riprodotto la cheratite parenchimatosa interstiziale su tre pecore in serie.*

***

E' ancora più importante quest'altra serie di esperienze iniziata col latte malato fornito dalla pecora V, che già rappresenta un secondo passaggio con esito positivo.

I. Il filtrato batteriologicamente sterile del latte fu inoculato nella camera anteriore dell'occhio destro di una pecora; l'occhio in capo a 15 giorni presentò nette le note macroscopiche della cheratite parenchimatosa con neoformazione vasale invadente la superficie corneale del *limbus cornealis.* L'occhio fu enucleato 20 giorni dopo l'inoculazione.

II. L'umor acqueo e l'emulsione del detrito corneale, ottenuta *more solito,* si vennero a inoculare rispettivamente nell'occhio sinistro e nel destro di un'altra pecora sana. L'affezione ebbe uno sviluppo più rapido e più in-

tenso, tanto che le prime alterazioni comparvero già fra il secondo e terzo giorno (L'inoculazione del vitreo fatta nella camera anteriore dell'occhio sinistro di un'altra pecora ebbe invece esito negativo).

III. L'umor acqueo, raccolto dagli occhi di questa pecora dopo dieci giorni e convenientemente allungato, fu inoculato nell'occhio sinistro di una pecora e nel destro di un capretto: le alterazioni caratteristiche si dimostrarono nell'uno e nell'altro, ma con maggior lentezza e minore intensità che nelle esperienze precedenti. Tuttavia nell'occhio destro del capretto si produsse fra il 12° e il 15° giorno una ulcerazione corneale e in conseguenza una perforazione con vuotamento parziale del bulbo.

IV. L'umor acqueo dell'occhio sinistro della pecora, raccolto il 20° giorno, e diluito al doppio, fu inoculato nell'occhio destro di un altro capretto e nell'occhio destro di un cagnolino: il primo ammalò, ma lentamente e con poca intensità; il secondo invece, tranne un lieve opacamento della cornea, che si manifestò dopo l'inoculazione e a poco a poco scomparve dopo quattro giorni, non presentò alcun che di notevole.

V. Per ultimo l'umor acqueo del capretto fu inoculato nell'occhio sinistro di un' agnella; ma dopo un accenno alla produzione di vasi ed un lieve grado di opacamento corneale, tutto ritornò al normale, salvo un leggero leucoma residuale.

La stessa agnella, dopo circa quattro mesi, e precisamente il 24 gennaio 1906, fu inoculata nella camera anteriore dell'occhio destro con otto gocce dello stesso virus filtrato, che si era dimostrato attivissimo negli esperimenti 8, serie I; 9, serie III; 10, serie IV.

Nei primi tre giorni si ebbe arrossamento della congiuntiva, opacamento diffuso della cornea, ma subito nei giorni successivi i fenomeni regredirono lasciando appena un leggero leucoma. Considerando la virulenza indiscutibile del filtrato iniettato, non è improbabile che l'agnello abbia conseguita *immunità a causa della inoculazione ricevuta circa quattro mesi prima con virus di 5° passaggio.*

***

Simili esperienze furono ripetute *anche in numerosi conigli* con filtrati di latte malato di varia provenienza, e con *esito sempre positivo;* le alterazioni riscontrate sono identiche a quelle che furono descritte nelle pecore e corrispondono ad una cheratite parenchimatosa con neoformazione di vasi nella cornea.

In due conigli si ebbe anche ulcerazione corneale e perforazione con votamento del bulbo.

Nel coniglio però la trasmissione da occhio ad occhio pare non conservi mai il virus, chè anzi questo si attenua e si esaurisce di solito già al terzo passaggio.

***

Di fronte alle precedenti esperienze d'inoculazione diretta, riuscite positive, ne ricordiamo *tre riuscite negative:*

I. Il 3 maggio 1904 col virus che aveva servito per inoculare la pecora I innestammo un'agnella nella camera anteriore dell'occhio destro.

II. Il 12 marzo 1905 alla pecora della esperienza negativa III della prima serie applicammo sulla cornea dell'occhio destro, precedentemente escoriata, virus filtrato di Garbagnano.

III. Il 12 maggio 1905, con questo medesimo virus furono fatte scarificazioni corneali alla pecora della esperienza negativa IV della prima serie.

Esperienze di controllo.

Le alterazioni oculari osservate potevano attribuirsi:

1° alla quantità del liquido adoperato;

2° alla eventuale penetrazione di bollicine d'aria;

3° alla reazione del filtrato (che del resto fu sempre neutro o quasi);

4° a sostanze presenti nel latte normale filtrato;

5° a sostanze derivanti dall'aggiunta dei batteri di controllo.

Per eliminare questi dubbi furono fatte inoculazioni:

1° con soluzione sterile di NaCl 0.85 per cento fino all'evidente refluire del liquido tra l'ago e la cornea;

2° con la stessa soluzione, immettendovi a bella posta bollicine d'aria;

3° con soluzioni diluite sterili di acido lattico o di carbonato sodico;

4° con latte normale di capra o di pecora filtrato;

5° col filtrato sterile di colture di b. prodigioso e b. fluorescente.

Queste esperienze di controllo furono alcune volte fatte nell'occhio destro o sinistro degli stessi animali che nell'altro occhio erano contemporaneamente inoculati col virus filtrato. L'esito di queste esperienze di controllo fu il seguente:

Nei primi 2-3-4 giorni si notava o nessuna alterazione, o, bene spesso, un opacamento più o meno diffuso della cornea; la qual cosa abbiamo già detto accadere anche negli occhi inoculati col virus. Ma dal 4° giorno in poi l'opacamento si circoscriveva e si andava gradatamente dileguando, senza lasciare spessissimo alcuna traccia; mentre negli occhi inoculati col filtrato è appunto allora che cominciano le alterazioni caratteristiche.

Riassunto delle esperienze della II serie.

Per due serie di esperienze su pecore siamo riusciti con dirette inoculazioni nell'occhio a riprodurre la cheratite parenchimatosa interstiziale che può accompagnare l'agalassia. L'infezione però non si estese nè alle mammelle nè alle articolazioni.

E mentre il virus si è conservato senza esaltarsi nei primi passaggi attraverso gli occhi di pecore, si è probabilmente esaurito in una serie al 5° passaggio di occhio in occhio, rispettivamente in un'altra serie al 7° passaggio prima da mammella a mammella e poi di occhio in occhio.

La cheratite caratteristica, come negli ovini, si è riprodotta sperimentalmente anche nei conigli, ma il virus si è esaurito già al 3° passaggio da occhio a occhio.

I precedenti risultati positivi non possono venire menomamente infirmati da 3 esperienze riuscite negative in 3 pecore, due delle quali dimostratesi già refrattarie ad altre inoculazioni di altro virus filtrato.

Nulla di notevole si è riprodotto nell'occhio della cavia e del cane.

Con nessun altro materiale inoculato nell'occhio di ovini e di conigli siam riusciti a riprodurre alcun che di simile alla cheratite caratteristica dell'agalassia.

VI. — Terza serie di ricerche.

Riproduzione sperimentale delle alterazioni articolari.

Esperimento 9° - *Pecora VII.* — Con lo stesso virus filtrato, che ha riprodotto l'agalassia con la cheratite nella pecora VI e il quadro completo della malattia nella pecora VIII (v. Esperimento 10°), fu inoculata questa pecora nelle articolazioni carpo-metacarpica sinistra e tarso-metatarsica destra (v. tab. 8 a pag. 295).

Già dopo due giorni le articolazioni erano tumefatte, arrossate e calde più delle corrispondenti sane; gli arti malati erano tenuti in semiflessione, senza più l'appoggio del piede sul terreno. Queste condizioni si aggravarono tanto che vi fu reazione febbrile per qualche giorno, e la pecora giacque atterrata, senza possibilità di muoversi. Dopo è venuta un po' migliorando, ma era sempre claudicante e con le articolazioni manifestamente ingrossate.

Dopo 9 giorni dall'inoculazione endoarticolare il latte, che già, pur rimanendo normale, a poco a poco era venuto diminuendo, scemò rapidamente e si alterò in maniera caratteristica. Questo fatto è importante perchè diede la *prova sperimentale della riproduzione a distanza dell'affezione mammaria*, e perchè fu seguìto da morte.

Autopsia. — Nella cavità addominale: liquido sieroso torbido, circa un litro, con soffusione ematica: distomi epatici nel fegato.

Nella cavità toracica: liquido simile al su detto, circa 1/4 di litro: cisti di echinococco nel polmone sinistro.

Mammelle: ridotte di volume, poco succolente. Alla sezione appare un notevole sviluppo di connettivo interstiziale, con atrofia del parenchima ghiandolare. Non si notano zaffi di alcuna sorta nei condotti galattofori.

Articolazione anteriore sinistra appare ingrossata a forma fusata. Tessuti periarticolari ispessiti. Scarso liquido filante nella cavità articolare. Lieve iperemia della sinoviale. Erosione piccola come un grano di canape nella cartilagine epifisaria inferiore.

Articolazione posteriore destra molto ingrossata, a fuso. Tessuti periarticolari ispessiti. Liquido sanguinolento, poche gocce, nella cavità articolare. Sinoviale fortemente iperemica, cosparsa di chiazze emorragiche, di aspetto vellutato. Erosioni multiple, con margini netti ma regolari, delle cartilagini epifisarie. Per l'esame microscopico v. fig. 3 della Tav. V.

Cosicchè l'esame anatomopatologico delle mammelle e delle articolazioni rivelò le stesse lesioni che nella malattia spontanea.

⁂

Nel 1904 si era anche tentato riprodurre l'artrite inoculando lo stesso filtrato dell'esperimento 1° nell'articolazione radiocarpica sinistra di un'agnella, ma senza successo. Simili inoculazioni con altro filtrato di latte malato furono ripetute nell'articolazione del ginocchio di due pecore sane: ma tenute in osservazione per lungo tempo (circa due mesi) non presentarono alcun sintomo di affezione articolare e alla necroscopia non furono riscontrate lesioni di sorta nella sinoviale e nei tessuti circostanti.

Anche la pecora dell'esperienza negativa III della prima serie, e II della seconda serie, il 22 maggio fu iniettata *nell'articolazione radio-carpo-metacarpica sinistra* con virus filtrato di Cognettaro (Caprarola): eziandio questa volta esito negativo. Il 30 agosto 1905 la pecora fu sacrificata, ma non fu osservata alcuna lesione.

Così pure alla pecora dell'esperienza negativa IV della prima serie e III della seconda, il 22 maggio fu iniettato *nell'articolazione tarso-metatarsica destra* lo stesso virus usato nella pecora precedente: anche questa volta esito negativo.

Tale esperimento fu ripetuto anche infruttuosamente nelle articolazioni femoro-tibiali di due conigli, nei quali per altro è bene avvertire che essendo le cavità articolari molto piccole, la quantità di filtrato che vi può rimanere è sempre scarsissima.

Riassunto delle esperienze della III serie.

Inoculando direttamente nelle articolazioni il virus (rispettivamente il latte) agalassico filtrato, si può riprodurre la periartrite ed artrite caratteristica, e insieme anche la agalassia stessa.

Questo risultato positivo non può venire menomato dalle esperienze d'inoculazione endarticolare d'altro virus filtrato riuscite negative in due pecore sane, e in altre due che avevano già impunemente per altre vie sopportato simili inoculazioni.

VII. — Quarta serie di ricerche.

Riproduzione sperimentale contemporanea di alterazioni mammarie, oculari e articolari.

Esperimento 10° - *Pecora VIII.* — Collo stesso virus adoperato per le pecore VI e VII si è inoculata un'altra pecora sana lattifera, il 28 dicembre 1905, per diverse vie, e precisamente:

Sotto la cute della regione paramammaria sinistra cmc. 4;

Nella camera anteriore dell'occhio sinistro gocce X;

Nell'articolazione radio-carpo-metacarpica sinistra cmc. 1.50 dello stesso virus.

Dalla tab. 9 (v. a pag. 296) appare che le lesioni oculari e articolari si sono riprodotte come nelle altre esperienze di infezione separata dell'occhio e delle articolazioni.

Inoltre dopo 11 giorni dall'inoculazione si è cominciato ad alterare il latte in maniera caratteristica, e per primo quello della mammella opposta al lato dell'inoculazione.

Riassunto delle esperienze della IV serie.

Inoculando contemporaneamente sotto cute, nell'occhio e nelle articolazioni il virus agalassico filtrato, abbiamo riprodotto il quadro completo dell'agalassia con le sue caratteristiche localizzazioni mam-

marie, oculari e articolari. *Come conclusione di tutte e quattro le serie di esperienze viene dunque ad essere messo fuori ogni dubbio che l'agalassia contagiosa delle pecore e delle capre è prodotta da un virus filtrabile, che si elimina col latte caratteristicamente alterato.*

VIII. — Esame ultramicroscopico del virus agalassico filtrato.

Abbiamo osservato all'ultramicroscopio di Siedentopf e Szigmondy alcuni esemplari di latte agalassico filtrato, riconosciuto sterile nel senso batteriologico della parola e dimostrato virulento dalle esperienze nelle pecore; e per controllo abbiamo ripetuto l'osservazione sul filtrato di latte di pecora normale.

Dopo avere accuratamente lavata la vaschettina con acqua di recente distillata e sterilizzata, e dopo avere constatato che nessuna particella era visibile nell'ultima porzione di acqua lasciata a bella posta nella vaschettina, si versava nell'imbuto il filtrato da esaminare, in modo da diluirlo quasi al doppio con acqua distillata sterile.

Ciò che si osserva in questi filtrati, tanto di latte agalassico, quanto di *latte normale*, non differisce sostanzialmente da quello che si vede nell'esame ultramicroscopico di altri liquidi colloidali organici. Un gran numero di minutissimi punti luminosi costituisce il fondo della zona centrale, sul quale spiccano particelle ancora più grosse e quindi più splendenti, rotondeggianti, circondate spesso, in date condizioni, da frange di diffrazione concentiche, iridescenti, e dotate di vivaci movimenti molecolari, per i quali si urtano reciprocamente e rimbalzano, mantenendosi in una continua trepidazione. La grandezza delle massime particelle luminose raggiunge dimensioni di poco inferiori a quelle che dimostrano in ugual condizioni di osservazione il b. del colera dei polli e il b. prodigioso. Nessuna particella luminosa appare dotata di un vero e proprio movimento di traslazione.

Nel filtrato di *latte agalassico* si sono notati aggruppamenti di 10-15-20 particelle rotondeggianti più grosse, da somigliare in certo qual modo a quelli che presentano al microscopio i comuni micrococchi; ma non si può annettere loro alcuna importanza, giacchè qualche volta, benchè non sempre e non così numerosi, se ne osservano nei filtrati di latte normale; e spesso se ne vedono anche in liquidi colloidali di altra natura (siero di sangue, liquido ascitico, brodo nutritivò sterile, ecc.). L'esito finora negativo di queste osservazioni non dice però nulla contro l'esistenza dell'agente morbigeno nel filtrato agalassico, pienamente dimostrata dai risultati delle esperienze in vivo. Si comprende facilmente che il riconoscere un microrganismo in un liquido colloidale mediante l'osservazione ultramicroscopica è possibile soltanto nel caso che esso abbia una forma speciale, differente da quella che hanno le particelle dei proteici sospese, o sia fornito di un movimento attivo, o presenti almeno un qualche caratteristico aggruppamento.

Se si tratta di germi piccolissimi, di forma rotondeggiante, immobili,

isolati o aggruppati in cumuli irregolari, essi ***non possono distinguersi all'ultramicroscopio dalle particelle di sostanze proteiche che vi sono sospese e mescolate.***

IX. — *Modi della propagazione naturale dell'epizoozia.*

Da tutto quanto precede risulta che sperimentalmente l'agalassia è una malattia da inoculazione di un virus filtrabile.

E' noto che in generale questi virus resistono poco agli agenti di sterilizzazione naturale; producono quindi malattie per contagio diretto o quasi, ovvero per inoculazione.

Empiricamente già si ritiene (v. pag. 261) che il *contagio diretto* o *semi diretto* può essere trasmesso, ad esempio, con la mano del pastore che munge.

Una riprova sperimentale di questa possibilità, ammessa anche dagli allevatori, è fornita dallo

Esperimento 11° - *Pecora IX.* — Una pecora sana lattifera fu prima tenuta in osservazione per 8 giorni, durante i quali forniva ogni giorno da ciascuna mammella circa 90-100 cmc. di latte normale.

Il 28 dicembre 1905 fu inoculata nel parenchima della mammella destra con 5 cmc. di una emulsione di grumi essiccati di latte malato e filtrato per Berkefeld per vedere se questo fosse un mezzo d'immunizzazione. Come risulta dalla tab. 10 (v. a pag. 297) diminuì subito la quantità del latte fornito dalla mammella inoculata; nei primi giorni il latte fu anche sanguinolento, ma del resto si conservò normale di aspetto, benchè la quantità si mantenesse sempre notevolmente bassa.

Nei giorni 11, 12, 13, 16 e 17 gennaio fu munta con le mani sporcate col latte caratteristico delle pecore VI, VII, VIII malate, munte precedentemente. Già fin dal giorno 17 la quantità del latte diminuì ancor più nella mammella destra, ed anche nella sinistra, senza però mutare l'aspetto in modo apprezzabile. Il 25 gennaio il latte cominciò a mostrare le alterazioni caratteristiche per poi scomparire del tutto e riapparire di nuovo, con le caratteristiche del latte malato.

Questa esperienza prova dunque la trasmissione del contagio per mezzo delle mani che mungono; il periodo d'incubazione appare leggermente prolungato, fino a circa 8-10 giorni.

Risulta inoltre che i grumi del latte agalassico essiccati, stemperati in soluzione di NaCl e filtrati per candele Berkefeld, non hanno alcun potere immunizzante.

E' noto, del resto, che i virus filtrabili possono in natura (rabbia, vaccino) penetrare anche per inoculazione.

Abbiamo perciò ricercato se ci fossero speciali *insetti propagatori*, e anzitutto se ve ne fossero attaccati alle pecore malate, e, in genere, a greggi colpiti dall'epizoozia.

D'ordinario addosso a pecore si posson trovare zecche, pulci e pidocchi, questi ultimi però soltanto nelle stagioni e nei luoghi di sofferenza e quindi sugli animali denutriti.

Or bene, in un'epizoozia del giugno 1905 ne trovammo di zecche un certo nu mero, ed erano *Rhipicephalus sanguineus*.

Poi durante l'epizoozia dell'aprile 1904 nei dintorni di Caprarola furono trovati addosso alle capre malate due specie di pidocchi: il *Trichodectes climax* (Nitzsch) e l'*Haemotopinus stenopsis* (Burm), i quali si riscontrano anche nelle pecore (1).

Nella stessa primavera del 1905, nella tenuta di Decimo, non trovammo punto insetti, e neppure quando l'epizoozia era acutissima pare se ne fossero trovati.

Invece nella tenuta Santa Marinella ne trovammo pochissime ed erano *Rhipicephalus bursa* e *Ixodes ricinus*.

Questi vari insetti furono tenuti digiuni per un paio di giorni e poi furono applicati in varie parti del corpo di ovini sani, vigilando che vi rimanessero attaccati e riapplicandoli tutte le volte che se ne distaccavano.

Questo inconveniente seguiva sempre, così che di una diecina di insetti che si applicavano solo due o tre rimanevano attaccati, e questi anche per breve tempo, giacchè dopo tre o quattro giorni gl'insetti o morivano o, benchè vivi, cadevano: i tentativi di riapplicazione venivano naturalmente ripetuti con insistenza.

Ecco le esperienze fatte:

I. Dei *Rhipicephalus sanguineus*, avendone ottenuti molti, si potè fare un'applicazione più copiosa e rinnovarla ogni giorno per una intera settimana. Furono adoperate due agnelle sane, le quali circa un mese e mezzo prima erano state senza successo inoculate una nella camera anteriore dell'occhio destro (v. a pag. 273, ultimo capoverso) e l'altra nell'articolazione radiocarpica sinistra con filtrato sterile di latte malato (v. a pag. 275, ultimo capoverso).

Addosso a queste due agnelle, in corrispondenza delle articolazioni, sulla faccia, e tra il vello in varie parti del corpo furono applicate ogni giorno una diecina di zecche. Quantunque l'inconveniente solito si ripetesse anche in queste esperienze, pure, atteso il gran numero di zecche applicate, per una settimana intera rimasero sugli animali in media 3-5 zecche al giorno.

Queste esperienze furono fatte sulle agnelle per vedere se fosse possibile la riproduzione di lesioni oculari ed articolari. Ma non furono osservate alterazioni di sorta durante i due mesi che le agnelle furono tenute in osservazione.

II. In una capra sana lattifera della Campagna romana furono applicate, il 14 marzo 1905, una diecina di zecche non nutrite, *Rhipicephalus bursa* e *Ixodes ricinus*, sulla cute delle mammelle e sulle cosce: la maggior parte se ne distaccarono, ma le applicazioni delle zecche cadute furono ripetute, come si è già detto, e dopo parecchi tentativi tre o quattro di esse rimasero attaccate per tre o quattro giorni appena, dopo i quali si distaccarono definitivamente e morirono. Queste poche in ogni modo avrebbero avuto il tempo di trasmettere il virus, nel caso che lo contenessero e che fossero capaci di inocularlo.

Il fatto è che nella produzione del latte della capra e nello stato anatomico delle mammelle, delle articolazioni, degli occhi, non furono osservate alterazioni di sorta, neppure dopo quattro mesi.

III. I pidocchi raccolti (una diecina) dalle capre malate a Caprarola furono applicati il 22 aprile 1905 sulla cute delle mammelle, delle cosce, e tra il vello dei fianchi di una pecora sana lattifera.

Furono osservati gli stessi inconvenienti su accennati, e si cercò di ovviare nello stesso modo: ma anche in questa esperienza i pochi pidocchi, che erano rimasti definitivamente attaccati coi numerosi tentativi, si staccarono dopo quattro o cinque giorni e morirono.

Anche in questa pecora non furono osservate alterazioni di sorta, neppure dopo due mesi.

---

(1) Della diagnosi e classificazione degli insetti dobbiamo esser grati al prof. dott. Giulio Alessandrini, libero docente di parasitologia nella nostra Università.

Cosicchè *mediante diversi artropodi trovati addosso a greggi infetti di agalassia non siamo riusciti finora a riprodurre questo morbo.*

In genere i pastori non dànno importanza a simili veicoli di epizoozia, e il fatto che questa può insorgere in tutte le stagioni e in luoghi dove mancano le zecche (alta montagna) confermerebbe la poca importanza che viene ed essi attribuita.

Ci riserviamo però di fare in proposito nuove osservazioni e nuovi esperimenti. Dobbiamo altresì vedere qual'è il limite di resistenza del virus nell'ambiente e quindi come e fino a che punto è giustificato il nome volgare di mal del sito.

X. — Primi tentativi di vaccinazione.

E' vecchio il metodo empirico del cosiddetto *accallamento*, che consiste nel mescolare animali sani con gli infetti, per far diffondere e cessar così più presto l'epizoozia.

Valentini (1) ricorda l'inoculazione preventiva di latte malato, senz'alcun trattamento preliminare; a questo modo però si corre il rischio che per lo meno alcuni capi ammalino gravemente.

Celli e Santori inocularono sotto cute ma senza risultato a pecore sane il siero di sangue di pecore guarite.

E' certa però, d'altronde, l'immunità consecutiva a malattia sofferta; e il Marra (2) registra l'esito negativo dell'inoculazione del latte negli animali che precedentemente soffersero la malattia.

Alcune già delle nostre esperienze riuscite negative, valgono a confermarci l'indiscutibile immunità naturale o consecutiva alla malattia sofferta; altre ci lasciano fondatamente sperare si possa giungere anche alla immunità artificiale.

Ricordiamo, ad es., che nei passaggi successivi da mammella a mammella e da occhio a occhio il virus si attenua e può forse arrivare a conferire una immunità (v. a pag. 273 esperienza V, serie seconda). Forse anche l'inoculazione intramammaria del virus contribuisce ad attenuarne la virulenza.

Ad ogni modo noi abbiamo seguito le due vie maestre che conducono alla immunità artificiale, cioè quella dei sieri e quella dei vaccini, con l'intendimento di esperimentarle isolatamente o insieme unite.

Avendo già dimostrato che il siero di sangue di animali guariti

(1) Loc. cit.
(2) Loc. cit.

non conferisce da solo immunità, volemmo vedere se mescolandolo al virus lo convertisse in vaccino, e così inoculammo due pecore con differenti quantità di una miscela a parti eguali di virus filtrato attivo e siero di sangue di pecora guarita. Son già passati circa 2 mesi e nessun mutamento s'è mai avuto nell'aspetto del latte.

Tentammo eziandio di esaltare il potere preventivo del siero continuando a inoculare virus ad animali con agalassia confermata (pecore VI, VIII e IX).

Avendo poi la fortuna di possedere un virus puro e ad alta virulenza, per ricavarne un vaccino lo sottoponemmo all'azione di temperature relativamente basse di 40° e di 45° C., quali posson bastare per l'attenuazione di virus filtrabili; e così inoculammo con differenti quantità del primo due pecore, ed altre due pecore con differenti quantità del secondo; neppure in queste pecore si ebbe alcuna alterazione nella produzione del latte, salvo una leggiera diminuzione della quantità fornita nei primi 3-4 giorni dopo l'inoculazione.

Dopo sette giorni dalla prima inoculazione le due pecore inoculate con virus filtrato scaldato a 40° C. ebbero una seconda inoculazione con virus non riscaldato, due la ebbero con virus meno attenuato della prima volta, e due con virus non attenuato.

Dieci giorni dopo la seconda inoculazione, tutte e sei le pecore vaccinate furono mescolate con le pecore infette VI, VIII, IX, e furono munte sempre colle mani prima sporcate con latte malato: ciò non di meno il latte non ha mai subìto diminuzione nè alterazione veruna.

Sono in corso altre esperienze di questo genere.

XI. — **Conclusioni generali.**

1° L'agalassia delle pecore e delle capre è indubbiamente una malattia contagiosa per mezzo del latte caratteristicamente alterato.

2° Considerata dal punto di vista anatomo-patologico, questa malattia consiste in un processo flogistico, con proliferazione del tessuto connettivo, la quale si manifesta:

a) nella mammella, con abbondante neoformazione connettivale interacinosa, formazione di polipi endocanalicolari, più o meno estesa atrofia del parenchima ghiandolare;

b) nella cornea, con una cheratite parenchimatosa interstiziale e neoformazioni vascolari, ad esito o in guarigione o in leucoma ovvero in ulcerazione corneale e panaftolmite;

c) nelle articolazioni, con un processo di artrosinovite a partire da un'infiltrazione parvicellulare del connettivo periarticolare e della

membrana sinoviale, venendo a focolai necrotici di questa e della cartilagine epifisaria, e a formazioni polipose endoarticolari quando la malattia è più avanzata. Mentre però le alterazioni della mammella sono costanti, quelle dell'occhio e delle articolazioni si manifestano solo in un certo numero di casi, variabile secondo l'intensità dell'epizoozia.

3° Tutti i moltissimi tentativi batteriologici e istologici fatti da noi e da altri per mettere in evidenza e coltivare l'agente causale dell'agalassia sono sempre riusciti infruttuosi.

4° Si può invece sperimentalmente dimostrare con tutta certezza che l'agalassia contagiosa è prodotta da un virus filtrabile che si elimina col latte malato.

5° Coll'ultramicroscopio non si riesce però a differenziarlo morfologicamente in mezzo alle particelle colloidi del latte filtrato.

6° Sperimentalmente, col virus (rispettivamente col latte) filtrato alle Berkefeld e alle Silberschmidt, mediante inoculazioni nel capezzolo, nel dotto galattoforo e talora anche nella mammella si può riprodurre l'agalassia; mediante inoculazioni nella cornea o anche nel dotto galattoforo e sotto cute, l'alterazione oculare; mediante inoculazioni endoarticolari, l'artrite e insieme l'agalassia; e infine mediante inoculazioni sottocutanee, oculari ed endoarticolari, il quadro clinico completo della malattia.

Al di fuori degli ovini e dei caprini, si può anche nei conigli riprodurre la cheratite parenchimatosa con le inoculazioni del virus filtrato nella camera anteriore.

7° Anche il quadro anatomo-patologico dell'agalassia e delle altre localizzazioni sperimentali è identico a quello che si riscontra nella infezione naturale.

8° Nulla di simile si può riprodurre nè con le inoculazioni di bacteri isolati dal latte o dagli occhi o dalle articolazioni malate, e nemmeno con vari materiali solubili.

9° Per riprodurre sperimentalmente l'agalassia, nel senso stretto della parola, fra le diverse vie d'inoculazione le più sicure sono quelle pel capezzolo, pel dotto galattoforo, sottocute e dentro le articolazioni.

Può esser bastevole, in certi casi, anche lo strofinare il virus sul capezzolo.

10. L'agalassia deve quindi in natura trasmettersi per contagio diretto o semidiretto, ovvero per inoculazione: se in ciò v'abbiano parte gli artropodi non potemmo finora dimostrarlo.

11. Il virus del latte di capra sperimentalmente non sembra differire da quello del latte di pecora.



Fig. 1.

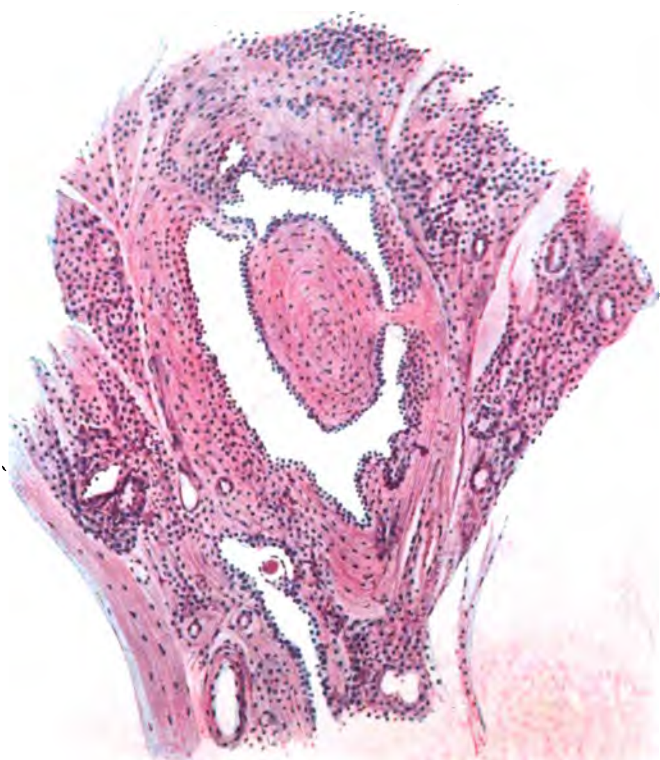


Fig. 2.

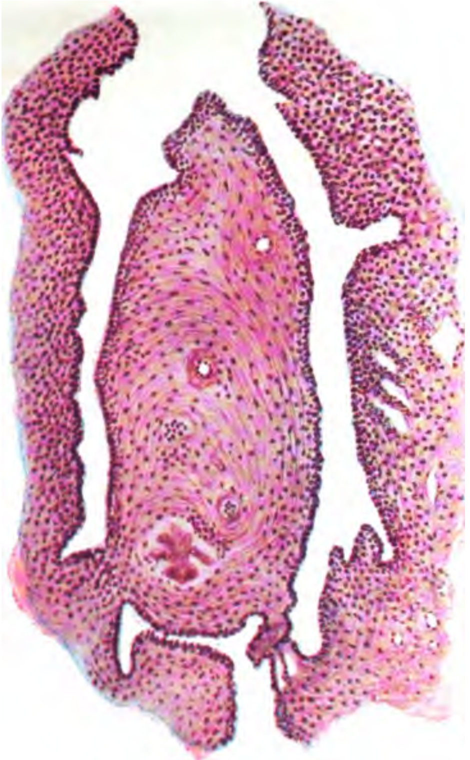


Fig. 3.

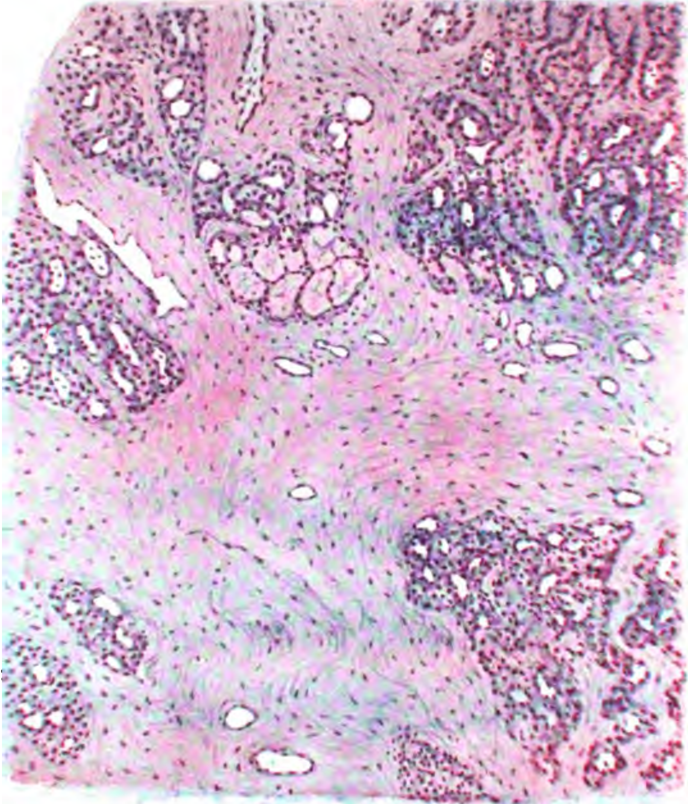


Fig. 4.



Fig. 1.

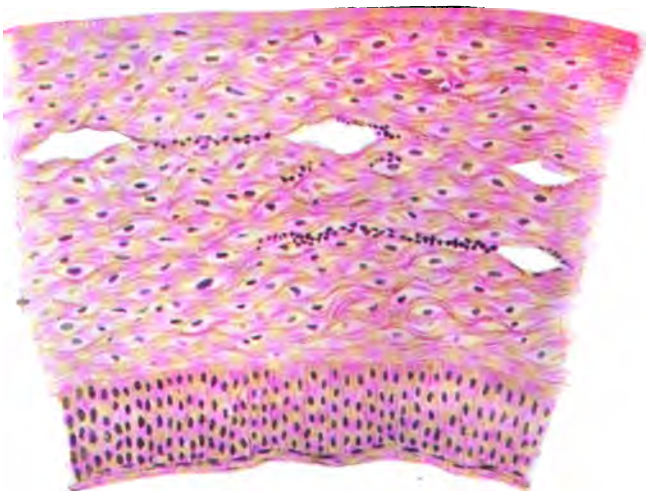


Fig. 2.

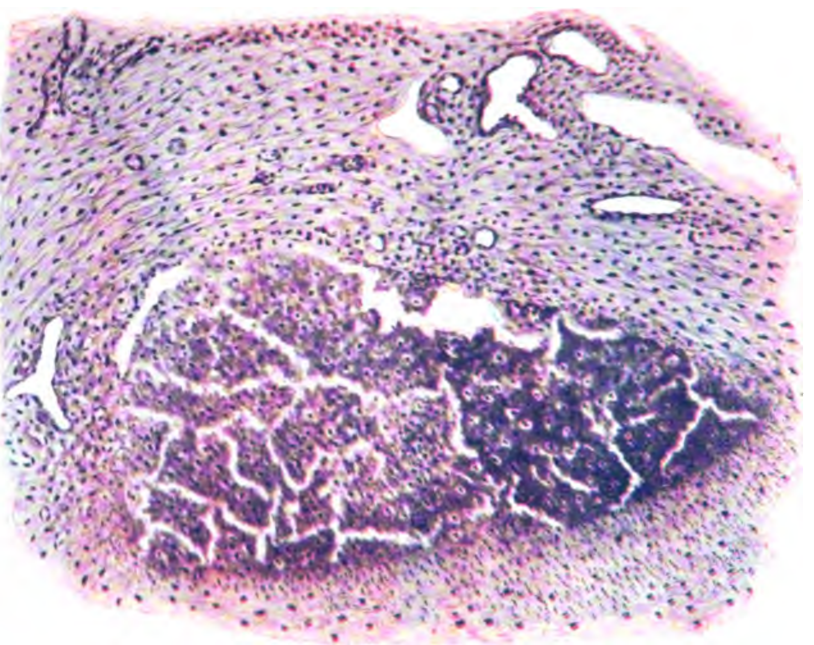


Fig. 3.

12. Il virus dell'agalassia è piuttosto labile, cioè in circa 3 mesi, anche in buone condizioni dell'ambiente (15° C, oscurità) si attenua; quindi anche questa proprietà conferma indirettamente la trasmissione nei modi suaccennati.

13. Il virus dell'agalassia attenuasi pure o per lo meno non si esalta nei passaggi successivi da animale ad animale, da occhio a occhio. E anche in natura dà luogo ad un'immunità consecutiva alla malattia sofferta.

14. Si ha già qualche ragione di credere che si possa, anche sperimentalmente, riprodurre un'immunità artificiale.

Roma, 31 marzo 1906.

Nel dar termine a questo lavoro ci sentiamo in dovere di ringraziare: la signora Anna Celli per tutta la parte di istologia patologica; il signor Raimondo Biasi, allevatore di pecore, pel continuo aiuto prestatoci con grande intelligenza ed esemplare disinteresse, nonchè i fratelli Rosi e il signor Dionisio Navone, per alcuni doni di pecore; i fratelli Rosselli per averci messo generosamente a disposizione una loro vigna pel pascolo degli animali; l'Ufficio del Tevere per averci offerto un pascolo gratuito; il Ministero dell'interno (Direzione generale di sanità) per averci accordato lire 1000 come concorso di spesa per l'acquisto di tanti animali (39 pecore e 5 capre); e infine i zooiatri dottori Marra, Valentini e Gualtiero Catastini, il quale ultimo ci ha sempre dato assidua e utile collaborazione in tante esperienze.

Spiegazione delle Tav. IV e V.

Tav. IV. *Fig. 1.* — Latte caratteristico della agalassia contagiosa: si vede diviso in due parti, una superiore sierosa, una inferiore grumosa. Questo latte fu dato dalla pecora VIII (pag. 276).

Fig. 2. — Sezione microscopica della mammella della pecora I, prima serie. Si vede la neoformazione connettivale del parenchima e la formazione di un polipo connettivale dentro un tubolo. Ingr. oc. 1, obb. 3 Seibert.

Fig. 3. — Sezione microscopica della mammella di pecora spontaneamente ammalatasi. Si vede, come nella fig. 2, un polipo endotubolare e la neoformazione connettivale del parenchima circostante. Ingr. oc. 1, obb. 3 Seibert.

Fig. 4. — Sezione microscopica della mammella di pecora ammalatasi spontaneamente. Si vede la neoformazione connettivale che invade e atrofizza gli acini del parenchima ghiandolare. Ingr. oc. 1, obb. 3 Seibert.

Tav. V. *Fig. 1.* — Occhio della pecora VI. Si vede la cheratite parenchimatosa con l'ulcerazione corneale in basso e nel mezzo.

Fig. 2. — Sezione microscopica della cornea della pecora II, seconda serie (pag. 272). Si vede la infiltrazione parvicellulare e la neoformazione vascolare. Ingr. oc. 1, obb. 5 Seibert.

Fig. 3. — Sezione microscopica della sinoviale della pecora VII (pag. 275). Si vede la infiltrazione parvicellulare della sinoviale e un focolaio necrotico. Ingr. oc. 1, obb. 7 Koritska.

TABELLA 1. — **Esperimento 1°.** - *Pecora I.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
27 aprile 1904 ..	12	14	20	20	Periodo di osservazione.
28 » ..	30	28	23	25	
29 » ..	31	31	29	31	
30 » ..	30	31	39	36	
1 maggio 1904..	28	29	25	25	Ore 10: inoculazione di virus.
2 » ..	34	6	19	2	Latte della mammella destra normale, quello della sinistra denso cremoso.
3 » ..	28	0	17	0	
4 » ..	27	0	42	0	
4 » ..	22	4	44	4.5	
5 » ..	22	5	34	4	
6 » ..	34	4	36	4	

TABELLA 2. — Esperimento 2°. - *Pecora I.*

DATA	Quantità del latte — Mattina — Mammella destra	Quantità del latte — Mattina — Mammella sinistra	Quantità del latte — Sera — Mammella destra	Quantità del latte — Sera — Mammella sinistra	*OSSERVAZIONI*
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
8 maggio 1904..	26	5	30	4	Latte della mammella destra normale, quello della sinistra cremoso.
9 » ..	20	5	20	2. 5	Come sopra, salvo che i 20 cmc. raccolti la sera dalla mammella destra si separano in un coagulo al fondo e una porzione sierosa soprastante.
10 » ..	10	2	9	2	Latte della mammella sinistra cremoso; quello ottenuto dalla mammella destra ha aspetto acquoso già appena sgorgato.
11 » ..	0. 5	5	0	5	
12 » ..	0	7	0	5. 5	
13 » ..	0	8	1. 5	3	I 3 cmc. raccolti la sera dalla mammella sinistra hanno consistenza minore del latte normale.
14 » ..	0. 75	0. 75	0. 5	0. 75	
15 » ..	2 gocce	0	0. 5	0. 5	Il latte della mammella destra continua ad avere l'aspetto acquoso caratteristico, e il siero che si separa ha sapore salato. Anche il latte della mammella sinistra ha preso l'aspetto acquoso, ma in grado minore.
16 » ..	0. 75	0	1	0	
17 » ..	2	0	1. 5	0. 5	
18 » ..	1	1	2	1	
19 » ..	1	1. 5	2	2	

TABELLA 3. — **Esperimento 3°.** - *Pecora II.*

DATA	Quantità del latte				*OSSERVAZIONI*
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
11 maggio 1904..	—	—	35	30	Periodo di osservazione.
12 » ..	20	20	15	13	
13 » ..	16	18	16	16	Ore 11: inoculazione di virus.
14 » ..	4	13	0. 5	15	Latte della mammella destra cremoso, della sinistra normale. La mammella destra presenta un ingorgo del parenchima, che dura immutato il 14 e il 15 e poi si riduce gradatamente.
15 » ..	3	13	0. 5	5	
16 » ..	0. 75	20	1 gocce	13	
17 » ..	3 gocce	19	5 gocce	7	Anche il latte della mammella sinistra è denso come quello della destra. La mammella sinistra presenta anch'essa un indurimento del parenchima ghiandolare. Il latte raccolto il 18 mostra tendenza alla separazione di piccole quantità di siero.
18 » ..	1 gocce	13	0	3. 5	
19 » ..	2 gocce	0	2 gocce	0	

TABELLA 4. — Esperimento 4°. - *Pecora III.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
3 giugno 1904..	15	16	20	22	Periodo di osservazione.
4 » ..	18	20	21	22	
5 » ..	18	17	20	15	Alle ore 10 si procede all'iniezione nel parenchima glandolare della mammella sin. con cmc. 1.75 di filtrato sterile di latte fornito da pecora sana.
6 » ..	38	20	8	14	
7 » ..	18	7.5	12	3.5	
8 » ..	22	17	22	12	
9 » ..	20	13	17	12	
10 » ..	36	35	21	17	Alle ore 10 si fa la inoculazione nel parenchima della mammella destra con cmc. 2.50 di siero di latte di vacca sterilizzato.
11 » ..	25	21	18	22	
12 » ..	6	20	6	12	Aspetto del latte sempre normale.
13 » ..	2.5	17	2	12	
14 » ..	2	13	1	6	
15 » ..	4	12	..	..	Alle ore 10 si fa la inoculazione di cmc. 1.75 di filtrato sterile di latte agalassico ottenuto dalla pecora n. 2, nella mammella sinistra.
16 » ..	9	4	5	1	Latte normale a destra, di aspetto cremoso a sinistra.
17 » ..	7	0.5	6	0.25	
18 » ..	8	1	8	0.75	

Segue TABELLA 4.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
19 giugno 1904..	10	1.5	7	1	Latte normale a destra; di aspetto sieroso, con fini grumetti, a sinistra.
20 » ..	12	3	8	4	
21 » ..	10	4	11	4	
22 » ..	10	5	9	5	
23 » ..	15	7	12	7	
24 » ..	18	12	13	6	
25 » ..	16	15	16	17	
26 » ..	18	17	10	7	Latte normale a destra, quasi normale a sinistra.
27 » ..	14	12	10	7	
28 » ..	15	13	14	12	
29 » ..	14	14	13	14	
30 » ..	15	16	10	8	
1 luglio 1904 .	12	15	7	6	
2 » ..	12	13	8	9	
3 » ..	14	13	7	9	
4 » ..	11	12	8	7	
5 » ..	14	12	7	7	5 luglio. Estirpazione della mammella sinistra.

TABELLA 5. — Esperimento 6°. - *Pecora IV.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
29 marzo 1905 . .	25	40	10	15	Periodo di osservazione.
30 » . .	15	18	20	22	
31 » . .	25	26	20	21	
1 aprile 1905 . .	22	19	20	22	
2 » . .	19	17	14	18	
3 » . .	10	12	2	4	Ore 11.30. Nel parenchima della mammella destra inoculazione di 2 cmc. di virus filtrato Salone.
4 » . .	1	2	1 goccia	8 gocce	
5 » . .	10 gocce	15	0. 50	1. 50	Denso e cremoso in tutte e due le mammelle.
6 » . .	0. 75	2. 50	0. 50	1. 50	
7 » . .	0. 25	1. 50	0. 50	1. 50	
8 » . .	0. 75	4	0. 50	2. 5	Irregolarmente ora denso, ora liquido con grumetti.
9 » . .	0. 50	2	0. 50	3. 5	
10 » . .	0. 50	4	3 gocce	10 gocce	
11 » . .	5 gocce	1	2 gocce	0.50	
12 » . .	8 gocce	1	4 gocce	0. 25	

Segue TABELLA 5.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
13 aprile 1905..	4 gocce	6 gocce	2 gocce	5 gocce	Latte sieroso.
14 » ..	0	6 gocce	0	10 gocce	
15 » ..	0	8 gocce	0	8 gocce	
16 » ..	0	7 gocce	0	5 gocce	
17 » ..	0	6 gocce	0	3 gocce	
18 » ..	0	2 gocce	0	0	
19 » ..	0	1 goccia	0	0	
20 » ..	0	0	0	0	
21 » ..	0	2 gocce	0	1 goccia	
22 » ..	0	0	0	0	
23 » ..	0	1 goccia	0	3 gocce	
24 » ..	0	0	0	4 gocce	
....	..	..	..	..	Assoluta mancanza di latte.
22 maggio 1905..	..	..	1	2	
23 » ..	2 gocce	0.5	2 gocce	2 gocce	Latte sieroso perfetto.
24 » ..	0	0	1 goccia	1 goccia	
25 » ..	1 goccia	1 goccia	0	0	
....	..	..	..	..	Assoluta mancanza di latte.
30 maggio 1905..	1 goccia	1 goccia	0	0	

TABELLA 6. — Esperimento 7°. - *Pecora V.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc	cmc.	cmc.	
7 maggio 1905..	..	..	40	50	Periodo di osservazione.
8 » ..	51	42	46	45	
9 » ..	24	38	19	47	
10 » ..	22	43	10	21	
11 » ..	22	25	13	14	
12 » ..	21	26	19	13	
13 » ..	18.5	7	11	23	
14 » ..	10	5	13	15	
15 » ..	13	4	12.5	2	
16 » ..	20	3	..	..	Inoculazione nella mammella destra ore 11. Mungitura sospesa fino alla sera del 17.
17 » ..	..	..	11	5	
18 » ..	9	7	6	2	Latte della mammella destra denso, cremoso; quello della sinistra normale.
19 » ..	1	3	3	2	
20 » ..	5	3.5	3	2	
21 » ..	2.5	3	3	2	
22 » ..	5	2	2	1	Il latte della mammella destra ha perduto l'aspetto cremoso, ma contiene parecchi grumetti piuttosto grossi. Il latte della mammella sinistra è quasi normale.
23 » ..	1.5	1	2	1	
24 » ..	4	2	2	1	
25 » ..	8	10	5	9	
26 » ..	2	2	2	2	

Segue TABELLA 6.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
27 maggio 1905..	4	3	1	2	Il latte della mammella destra continua a contenere parecchi grumetti; quello della mammella sinistra appare più acquoso del normale.
28 » ..	3	4	2	1	
29 » ..	1	4	2	1	
30 » ..	3	3	2	2	
31 » ..	4	4	3	1.5	
1 giugno 1905..	5	4	3	2	
2 » .	10	8	4.5	7	
3 » ..	1.5	1	2	1	
4 » ..	2	1	1	1	Il latte diventa sieroso e salato, tanto quello fornito dalla mammella destra quanto quello fornito dalla sinistra.
5 » ..	2	1	1	1.5	
6 » ..	7 gocce	8 gocce	5 gocce	6 gocce	
7 » ..	1	0.5	0.5	0.75	
8 » ..	0.5	8.5	0.5	4	
9 » ..	0.5	6	2 gocce	6 gocce	
10 » ..	1	3	0.5	0.5	
11 » ..	3	0.5	..	..	Continuano i caratteri sopra descritti.
12 » ..	1	0.5	0.5	3 gocce	
13 » ..	1.5	1	0.5	0.5	
14 » ..	0.5	0.5	0.5	0.75	
15 » ..	0.5	7 gocce	0.5	4 gocce	
16 » ..	4 gocce	5 gocce	0.5	2 gocce	
17 » ..	0.5	2 gocce	0.5	3 gocce	

TABELLA 7. — Esperimento 8°. - *Pecora VI.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
22 dic. 1905. . . .	—	—	48	69	
23 »	131	129	80	55	Periodo di osservazione.
24 » (ore 12).	99	103	—	—	
25 » (ore 12).	64	50	—	—	
26 »	68	89	58	58	
27 »	61	45	37	39	
28 »	49	50	12	35	Alle ore 11.30 si fanno punture ed instillazioni sul capezzolo destro in numero di 7 (cmc. 0. 50) di virus S. Marinella. Iniezione nel condotto galattoforo destro cmc. 4.
29 »	22	76	8	68	Latte normale.
30 »	21	73	8	95	
31 »	14	67	10	80	
1 gen. 1906 (ore 12).	4 (fini grumetti)	72	—	—	
2 »	4 gocce (sieroso)	60	4 gocce (sieroso)	40	Latte sieroso caratteristico a destra, normale a sinistra.
3 »	1	63	0. 5	28	
4 »	1	72	0. 5	42	
5 »	1	76	1	56	Si sporcano colla mungitura, mattina e sera, i capezzoli.
6 »	1	34 (normale)	1	36 (normale)	

Segue TABELLA 7.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
7 gen. 1906	0. 5	8 (sieroso)	—	—	Latte d'ambedue le mammelle sieroso caratteristico.
8 »	7 gocce	14	2 gocce	1	
9 »	4 gocce	8 gocce	3 gocce	0. 5	
10 »	4 gocce	1 goccia	3 gocce	1 goccia	
11 »	5 gocce	2 gocce	0. 5	2 gocce	
12 »	7 gocce	1 goccia	5 gocce	0	
13 »	5 gocce	0	5 gocce	0	
14 » (ore 12).	5 gocce	0	—	—	
15 »	3 gocce	4 gocce	5 gocce	4 gocce	
16 »	1 goccia	2 gocce	2 gocce	4 gocce	Nuova iniezione di virus sotto cute nella ascella.
17 »	0	0	0	5 gocce	
18 »	0	1 goccia	0	1 goccia	
19 »	0	0	0	0	
20 »	0	2 gocce	0	0	
21 » (ore 12)	0	0	—	—	
22 »	0	3 gocce	0	2 gocce	
23 »	0	3 gocce	0	0	
24 »	0	4 gocce	0	0	
25 » . . .	0	4 gocce	8 gocce	5 gocce	
26 »	4 gocce	4 gocce	0	3 gocce	S'inizia la cheratite nell'occhio destro.
27 »	0	4 gocce	0	2 gocce	
28 » (ore 12).	0	4 gocce	—	—	
29 »	0	0	0	0	
30 »	0	0	0	0	
31 »	0	0	0	4 gocce	Cheratite parenchimatosa diffusa.

TABELLA 8. — Esperimento 9°. - *Pecora VII.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
22 dic. 1905. . . .	—	—	71	76	
23 »	83	108	53	49	Periodo di osservazione.
24 » (ore 12).	105	110	—	—	
25 » (ore 12).	66	102	—	—	
26 »	119	123	26	35	
27 »	63	81	56	41	
28 »	81	79	30	42	Alle ore 11 s'inocula virus nell'articolazione del carpo sinistro cmc. 1.50. Nella articolazione del tarso destro cmc. 2.
29 »	64	76	40	30	
30 »	55	65	47	42	Articolazioni tumefatte, arrossate, tenute in semiflessione.
31 »	50	62	43	50	
1 gen. 1906 (ore 12).	60	62	—	—	
2 »	60	80	38	32	
3 »	45	67	21	23	Claudicazione; abbattimento generale.
4 »	47	61	23	24	
5 »	52	38	22	18	
6 »	32	36	12	20	
7 » (ore 12).	2 (sieroso)	12	—	—	
8 »	1 (sieroso)	8 (sieroso)	1 (sieroso)	5 (sieroso)	
9 »	4 gocce	1	3 gocce	0. 5	Latte caratteristicamente alterato.
10 »	2 gocce	1 goccia	2 gocce	2 gocce	
11 »	0	0	0	0	
12 »	0	0	0	0	
13-20 »	0	0	0	0	
21 » mattina.	..	..	..	..	L'animale si trova morto.

TABELLA 9. — Esperimento 10. - *Pecora VIII.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
22 dic. 1905. . . .	..	..	44	82	
23 »	87	65	81	79	Periodo di osservazione.
24 » (ore 12).	70	69	..	..	
25 » (ore 12).	34	52	..	..	
26 »	63	71	29	30	
27 »	59	63	79	45	
28 »	85	51	24	28	Si inoculano sotto alla cute della regione mammaria sinistra 4 cmc. di virus filtrato S. Marinella. Nella camera anteriore dell'occhio sinistro gocce 10. Nell'articolazione del carpo sinistro cmc. 1.50.
29 »	10	30	20	32	
30 »	34	40	18	41	
31 »	30	41	20	35	
1 gen. 1906 (ore 12).	33	42	..	..	Neoformazione di vasi sulla cornea. Tumefazione, rossore, e aumento di calore nell'articolazione inoculata. Latte normale.
2 »	30	40	24	38	
3 »	8	32	16	22	
4 »	10	35	24	38	
5 »	26	43	30	28	
6 »	28	42	25	27	
7 » (ore 12).	27	29	..	..	
8 »	24 (sieroso e purulento)	31 (normale)	26 (sieroso)	28 (quasi normale)	Continuano le lesioni cheratiche, ma lievi e senza opacamento della cornea. Permane la claudicazione dovuta alla lesione articolare. Il latte è caratteristicamente alterato.
9 »	3 gocce (sieroso e purulento)	16 (sieroso)	2 gocce (sieroso)	10 (sieroso e purulento)	
10 »	2 gocce (sieroso)	14 (sieroso e purulento)	2 gocce	10 (c. s.)	
11 »	0	0	0	0	
12 »	0	0	0	0	
13 »	2 gocce (sieroso)	0	0	0	L'articolazione migliora. I vasi corneali non avanzano più. Si mescola colle pecore VI e VII.

Segue Tabella 9.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
14 gen. 1906 (ore 12).	0	0	..	..	
15 »	0	0	0	0	I vasi corneali accennano a regredire.
16 »	0	0	2 (sieroso)	2 (sieroso)	Alle ore 17 nuova inoculazione sotto cute nella regione paramammaria destra di 1 cmc. di filtrato S. Marinella. Articolazione come sopra. Si nota sulla cornea sinistra, parallelo alla linea equatoriale, poco però sotto di essa, un opacamento nubecolare lineare lungo circa $^3/_4$ di cm. e all'estremità esterna di esso un punto molto più opaco.
17 »	1	1	5 gocce	5 gocce	Latte sieroso, talora tinto leggermente di sangue.
18 »	5 gocce	5 gocce	0	5 gocce	
19 »	2 gocce	3 gocce	5 gocce	1	
20 »	3 gocce	1	8 gocce	1	
21 » (ore 12).	1	1	..	..	
22 »	1	1	10 gocce	10 gocce	Latte sieroso, ma più ricco di grumi; talora sanguinolento.
23 »	6 gocce	6 gocce	6 gocce	5 gocce	
24 »	3 gocce	5 gocce	0	8 gocce	
25 »	1 goccia	1 goccia	1 goccia	4 gocce	
26 »	0	2 gocce	0	3 gocce	
27 »	0	0	0	0	
28 »	0	0	..	..	
29 »	0	0	0	0	
30 »	0	0	0	0	
31 »	0	0	0	4 gocce	

TABELLA 10. — Esperimento 11°. - *Pecora IX.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
22 dic. 1905. . . .	..	..	32	28	Periodo di osservazione.
23 »	69	81	35	39	
24 » (ore 12).	51	77	..	..	
25 » (ore 12).	30	46	..	..	
26 »	65	61	23	21	
27 »	39	65	35	41	
28 »	66	81	10	11	Si inoculano entro il parenchima della mammella destra (lato esterno) 5 cmc. di filtrato per Berkefeld di una emulsione della parte grumosa essiccata di latte malato.
29 »	6	20	2	12	Latte della mammella destra sanguinolento.
30 »	1	39	1	19	
31 »	2	35	1. 5	23	
1 gen. 1906 (ore 12).	3 (quasi normale)	32	..	..	
2 »	4 (normale)	34	2	18	
3 »	4	35	4	14	
4 »	4	32	3. 5	25	
5 »	4	41	2	29	
6 »	3	42	2	26	
7 » (ore 12).	2	17	..	..	
8 »	8	40	2.5	25	
9 »	3	32	2	12	
10 »	6	31	2	14	

Segue TABELLA 10.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
11 gen. 1906	5	32	4	21	11-12-13, gennaio ore 17. Si mungono ambedue le mammelle e dopo si continua a fare l'atto di mungere colle mani prima sporcate del latte malato delle altre pecore.
12 »	6	37	4	25	
13 »	7. 5	34	5	31	
14 » (ore 12).	7	39	. .	. .	
15 »	7	32	4	27	
16 »	5	34	2	16	16-17 gennaio, ore 17. Si ripete lo sporcamento nel modo indicato più sopra per i giorni 11, 12, 13.
17 »	1 (normale)	3 (normale)	2 (normale)	2 (normale)	
18 »	3 gocce (poco più denso)	10	3 gocce	3. 5	Latte normale.
19 »	2	29	1	10	
20 »	2	32	1	12	
21 » (ore 12).	3	32	. .	. .	
22 »	2	30	2	8	
23 »	2	34	1	12	
24 »	3	33	1 (piuttosto denso)	16	Alle ore 17, nuova inoculazione nel galattoforo sinistro di 1 cmc. di virus filtrato.
25 »	2 (denso grumoso)	5 (normale)	1 (denso grumoso)	2 (quasi normale)	
26 »	6 gocce	3 gocce (grumoso)	0	2 (grumoso)	
27 »	0	2 (grumoso)	0	2 (grumoso)	
28 » (ore 12).	0	1 (grumoso)	. .	. .	
29 »	0	0	0	0	
30 »	0	0	0	0	
31 »	0	0	0. 75 (siero)	2 (sieroso)	

Laboratorio Batteriologico e Medico-Micrografico
della Direzione di Sanità

Su alcune cause di errore della reazione del rosso colerico

pel Dott. A. **PALADINO-BLANDINI**, Assistente.

(Con la Tav. VI).

Eseguendosi in questo laboratorio alcune esercitazioni pratiche sulla diagnosi batteriologica del colera, in alcuni dei saggi alla Schottelius istituiti con fecce cui era stata addizionata una cultura pura di vibrione colerigeno, fu notato che mentre dopo circa 12 ore di incubazione a 37° la reazione del rosso era palese ed intensa nei liquidi di cultura, a 24 ore di distanza la stessa reazione venne a fare completamente difetto, anche dopo l'aggiunta, oltre che dell'acido solforico concentrato, di nitrito potassico in soluzione 1 $^{0}/_{000}$.

Ora gli è vero che la reazione del rosso colerico ha oramai perduto gran parte del suo antico valore, non solo perchè la scienza dispone oggi di nuovi e più sicuri presidî diagnostici, ma anche perchè l'indagine sperimentale ha assodato che la stessa reazione può far difetto in culture di autentico vibrione del colera (Celli e Santori), e riscontrarsi invece presso banali vibrioni delle acque. Essa ha però, tuttavia, sempre un significato notevole; era pertanto giustificato l'interesse preso al riguardo dal capo di questo laboratario, prof. Gosio, che m'incaricava di indagare le cause che potevano presumibilmente aver dato luogo al cennato reperto il quale veniva a stabilire una eccezione ancora imprevista.

E vengo senz'altro a riferire sulle ricerche eseguite.

In due matracci contenenti 1 litro di acqua peptonata ciascuno (acqua 1000 cmc., peptone Witte gr. 10, cloruro sodico gr. 5) verso 1 cmc. per parte di emulsione di fecce umane in soluzione fisiologica e quindi in uno 1 cmc.

Segue TABELLA 7.

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
7 gen. 1906	0.5	8 (sieroso)	—	—	Latte d'ambedue le mammelle sieroso caratteristico.
8 »	7 gocce	14	2 gocce	1	
9 »	4 gocce	8 gocce	3 gocce	0.5	
10 »	4 gocce	1 goccia	3 gocce	1 goccia	
11 »	5 gocce	2 gocce	0.5	2 gocce	
12 »	7 gocce	1 goccia	5 gocce	0	
13 »	5 gocce	0	5 gocce	0	
14 » (ore 12).	5 gocce	0	—	—	
15 »	3 gocce	4 gocce	5 gocce	4 gocce	
16 »	1 goccia	2 gocce	2 gocce	4 gocce	Nuova iniezione di virus sotto cute nella ascella.
17 »	0	0	0	5 gocce	
18 »	0	1 goccia	0	1 goccia	
19 »	0	0	0	0	
20 »	0	2 gocce	0	0	
21 » (ore 12)	0	0	—	—	
22 »	0	3 gocce	0	2 gocce	
23 »	0	3 gocce	0	0	
24 »	0	4 gocce	0	0	
25 »	0	4 gocce	8 gocce	5 gocce	
26 »	4 gocce	4 gocce	0	3 gocce	S'inizia la cheratite nell'occhio destro.
27 »	0	4 gocce	0	2 gocce	
28 » (ore 12).	0	4 gocce	—	—	
29 »	0	0	0	0	
30 »	0	0	0	0	
31 »	0	0	0	4 gocce	Cheratite parenchimatosa diffusa.

TABELLA 8. — Esperimento 9°. - *Pecora VII.*

DATA	Quantità del latte				OSSERVAZIONI
	Mattina		Sera		
	Mammella destra	Mammella sinistra	Mammella destra	Mammella sinistra	
	cmc.	cmc.	cmc.	cmc.	
22 dic. 1905. . . .	—	—	71	76	
23 »	83	108	53	49	Periodo di osservazione.
24 » (ore 12).	105	110	—	—	
25 » (ore 12).	66	102	—	—	
26 »	119	123	26	35	
27 »	63	81	56	41	
28 »	81	79	30	42	Alle ore 11 s'inocula virus nell'articolazione del carpo sinistro cmc. 1.50. Nella articolazione del tarso destro cmc. 2.
29 »	64	76	40	30	
30 »	55	65	47	42	Articolazioni tumefatte, arrossate, tenute in semiflessione.
31 »	50	62	43	50	
1 gen. 1906 (ore 12).	60	62	—	—	
2 »	60	80	38	32	
3 »	45	67	21	23	Claudicazione; abbattimento generale.
4 »	47	61	23	24	
5 »	52	38	22	18	
6 »	32	36	12	20	
7 » (ore 12).	2 (sieroso)	12	—	—	
8 »	1 (sieroso)	8 (sieroso)	1 (sieroso)	5 (sieroso)	
9 »	4 gocce	1	3 gocce	0. 5	Latte caratteristicamente alterato.
10 »	2 gocce	1 goccia	2 gocce	2 gocce	
11 »	0	0	0	0	
12 »	0	0	0	0	
13-20 »	0	0	0	0	
21 » mattina.	..	..	..	..	L'animale si trova morto.

fatto analogo accade se invece che sulla soluzione di nitroso-indolo, si fa agire la corrente di idrogeno solforato sulla soluzione acquosa di indolo, oppure sulla cultura di colera in acqua peptonata.

Una goccia di soluzione satura acquosa di indolo viene diluita in 10 cmc. di acqua, ed in pari tempo si approntano dei filtrati alla candela di acqua peptonata su cui per una settimana di seguito si erano fatti sviluppare 6 campioni differenti di vibrioni del colera (colera Feifer, c. n. 578, c. n. 724, c. n. 267, c. n. 509, c. n. 903) filtrati che vengono distribuiti ciascuno in un tubo da saggio e in quantità di 10 cmc. Attraverso tutti i sette campioni di liquido in esame si fa passare contemporaneamente e per due ore di seguito una corrente di idrogeno solforato; addizionati quindi gli ultimi sei con quattro gocce di acido solforico, l'altro con 1 cmc. della solita soluzione di nitrito potassico e la stessa quantità di acido solforico, viene a mancare in tutti ogni traccia di colorazione rossa. La reazione eseguita invece su altri sette saggi compagni, di controllo, si è mostrata in tutti positiva.

Ora, questo che si verifica artificialmente, si può ugualmente vedersi verificare in condizioni naturali.

In quattro matracci, muniti ognuno del proprio sifone, metto acqua peptonata addizionata di fiore di zolfo in quantità di 2, 4, 8, 10 mg. °/₀₀ innesto tutti i matracci — già sterilizzati — con lo stesso campione di vibrione del colera (colera Feifer) e li lascio a 37°. Una cartina all'acetato di piombo sospesa al tappo di ciascun matraccio mi avverte col suo annerimento che già dopo 8 ore di incubazione in tutte le culture, per quanto con non uguale intensità, si ha produzione di idrogeno solforato.

Prelevo allora da ognuna delle quattro culture un primo saggio di 10 cmc. di liquido, e su di esso eseguo la reazione del rosso colerico; ripeto il prelevamento e la reazione dopo 24 ore dall'innesto, e poi ancora per una terza volta dopo 30 ore, ed ho il risultato seguente:

TABELLA II.

Reazione del nitroso-indolo	Matr. I S = 2 mg. %	Matr. II S = 4 mg. %	Matr. III S = 8 mg. %	Matr. IV S = 10 mg. %	*Osservazioni*
d. 8 h. dall'innesto	+	+	—	—	La cartina all'acetato di Pb. del 1° matraccio dopo 22 h. si presenta leggermente annerita; le altre annerite fortemente.
» 22 »	±	—	—	—	
» 30 »	±	—	—	—	

Da ciò mi sembra logico dedurre, generalizzando, che data una attiva produzione di idrogeno solforato, dipenda essa o da speciale

composizione del terreno di cultura o da proprietà più da vicino inerenti ai singoli germi che vengono a svilupparsi col vib. colerico nei saggi alla Schottelius, o dall'azione di più germi insieme, qualora la quantità del gas prodotto raggiunga un limite adeguato, la reazione del rosso può, o non mostrarsi affatto, o dopo essersi mostrata scomparire.

La reazione può quindi in progresso di tempo venire a mancare o per la distruzione dei nitriti, o perchè l'indolo ha subìto per opera dell'idrogeno solforato modificazioni tali da non potersi più combinare all'acido nitroso dei nitriti, ma si può avverare il caso che nitriti si trovino nel liquido di cultura, che accanto ad esso si trovi pure dell'indolo inalterato, e tuttavia la reazione, dopo l'aggiunta di acido solforico, non si manifesta. E ciò accade quando o i nitriti, o l'indolo si trovano in eccesso nel liquido in prova.

In tre provette ho posto 9 cmc. di acqua distillata e due goccie di una soluzione satura acquosa di indolo per ciascuna; ad una di esse ho quindi aggiunto 1 cmc. di una soluzione a 1 $^{0}/_{00}$ di nitrito potassico, ad una seconda ed alla terza rispettivamente 1 cmc. di soluzione di nitrito a 1 $^{0}/_{000}$ e 1 $^{0}/_{00}{}^{00}$; in tutte quindi 4 gocce di acido solforico concentrato. La reazione del nitroso-indolo comparisce in tutti e tre i saggi, con una intensità però nettamente crescente dal primo all'ultimo; si ha cioè nel primo saggio (nitrito all'1 $^{0}/_{00}$) una lieve colorazione rosea tendente al gialletto che diventa invece di un bel rosso-violaceo nell'ultimo.

Dell'esito dell'esperimento ho conservato la copia dimostrativa nel fotogramma ritratto alla fig. 1 tav. VI.

In una seconda esperienza (v. fig. 2, tav. VI) ho posto la solita acqua distillata in quantità crescente da 7 a 9 cmc. in tre coppie di tubi, di cui ho fatto due gruppi *A* e *B*, riunendo nel gruppo *A* quelli in cui il volume del liquido veniva portato a 10 cmc. con soluzione acquosa di nitrito 1 $^{0}/_{00}$, e nel gruppo *B* quelli in cui la soluzione di nitrito usato allo stesso scopo scendeva al titolo di 1 $^{0}/_{000}$. In tutti fu aggiunta una goccia della solita soluzione di indolo prima e poi 4 di acido solforico.

Ora, paragonando fra loro le varie ombre dei diversi saggi riuniti nella cennata fig. 2, si vedrà dal fotogramma risultare tali differenze per cui si deve dire che nei tre saggi del gruppo *A* la reazione ha una intensità quasi generalmente uniforme e per altro in tutti così debole da non fare ammettere una cospicua differenza fra l'ostacolo da essi opposto al passaggio dei raggi luminosi e quello opposto da un semplice tubo di acqua distillata (controllo). Marcatissima è invece la differenza di intensità fra le varie reazioni dei tre saggi del gruppo *B*: intensa nel 1° (1 cmc.) va rapi-

damente facendosi meno sensibile nei due tubi successivi tanto da potere avere nel fotogramma l'ombra dell'ultimo (3 cmc.) molto vicina per intensità a quella del tubo di controllo.

Aumentando adunque la quantità dei nitriti, la reazione del nitroso-indolo perde in intensità, c'è il caso che essa si renda meno palese, e, aggiungo, finisce anche con lo scomparire. A questo estremo io non ho cercato di pervenire, in quanto che mi è parso inutile al riguardo moltiplicare le esperienze dopo le categoriche affermazioni, basate sull'esperimento, di Nencki e Salkowski (*Virchow's Archiv* - 1887, vol. CX, p. 367) e di Bleisch (*Zeits. f. Hyg.*, vol XIV, p. 103) i quali, l'uno dopo l'altro di accordo stabiliscono che procedendo innanzi con l'aggiunta di nitrito, superato anche di poco l'ottimo necessario, dopo l'aggiunta di acido solforico in liquido contenente indolo, si ha una colorazione gialla dovuta alla formazione di nitroprodotti — forse di nitrofenolo — che non ha nulla che vedere con la caratteristica colorazione rosso-vinosa del nitroso-indolo.

Maggiore cura ho invece dato alla dimostrazione di una circostanza analoga di cui, per quello che io so, gli autori non hanno fatto il dovuto conto, e cioè che agli effetti della reazione del rosso l'eccesso di indolo produce le medesime conseguenze che l'eccesso di nitrito.

In 10 tubi da saggio metto 1 cmc. di soluzione di nitrito 1 $^{\circ}/_{\circ\circ\circ}$ e 9 cmc. di acqua distillata per ciascuno, e aggiungo poi in uno $^{1}/_{4}$ di goccia di soluzione satura di indolo, in un altro $^{1}/_{2}$, in un terzo 1 e poi 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 gocce nei rimanenti, successivamente. In ciascuno addiziono quindi 4 gocce di acido solforico, aspetto al giorno appresso onde dare agio alla reazione di espletarsi nella sua interezza, filtro in modo da eliminare il precipitato in parecchi saggi formatosi e allestisco il fotogramma di cui alla fig. 3 tavola VI.

La reazione quasi negativa nei primi 4 saggi ($^{1}/_{4}$-2 gocce) comincia a farsi più manifesta nel 5° (4 gocce), raggiunge il suo massimo d'intensità nel 7° (8 gocce), quindi quasi bruscamente torna a rendersi poco palese nei successivi (10-20 gocce).

Il fotogramma però non permette di rilevare una particolarità, la seguente: Il saggio 8° (10 gocce) ha come il 1°, 2°, 3°, 4° ($^{1}/_{4}$ a 2 gocce) una tinta lievemente rosea, mentre i due saggi 9° e 10° hanno una tinta decisamente gialletta, ciò che se per gli effetti di luce ha la medesima conseguenza, ci porta invece a conseguenze assai differenti dal punto di vista di quei pratici risultati di cui andiamo cercando la base sperimentale; in quanto che ci consente solo di dire

che se in un tubo di cultura nel quale sia stata eseguita da 24 ore la reazione del rosso, se, dico, in questo tubo la quantità di indolo prodotto dal germe è in tenue quantità può ancora essere rilevata come positiva, per quanto debole, la reazione cercata; mentre che se la quantità di indolo è eccessiva la reazione medesima può avere un indiscutibile esito negativo.

Se però si tien conto di quello che accade subito dopo l'aggiunta di acido solforico in saggi preparati come sopra ho riferito, le conclusioni a cui sono ora venuto parrebbe che dovessero avere una non lieve modificazione, in quanto che in questo caso anche nei saggi 9° e 10° (15 e 20 gocce) la colorazione rossa si manifesta; ma, come il Salkowski avvertiva che l'eccesso di nitrito può portare alla mancanza della reazione del nitroso-indolo o, aggiungeva, alla sua fugace comparsa, lo stesso avviene anche in questo caso: la colorazione rossa del saggio si appalesa, ma subito il liquido s'intorbida, il rosso degrada in roseo, e volge quindi rapidamente e nettamente al giallo. Bisognerebbe quindi in pratica poter carpire quest'attimo, o correre il rischio di dichiarare anindolico un germe che viceversa è troppo energico produttore di indolo. Ma a questo non ci si ferma; dappoichè se si aumenta ancora la quantità dell'indolo, anche questa transitoria colorazione rossa non apparisce e cede il posto alla colorazione gialla che si manifesta di primo acchito.

A maggiore intelligenza del fatto riassumo nel quadro seguente una di queste esperienze che ritengo assai dimostrativa:

Tabella III.

N. d'ordine	CONTENUTO DEI DIVERSI SAGGI	COLORITO ASSUNTO				
		subito	d. ¼ d'ora	d. ½ ora	d. 1 ora	d. 16 ore
1	Acqua dist. 9 cmc. + 1 cmc. nitrito pot. $^1/_{000}$ + 1 goccia indolo + 4 goccie H_2SO_4	roseo	roseo	roseo	roseo	roseo
2	» » » » 2 » »	rosso	rosso	rosso	rosso	rosso torb.
3	» » » » 3 » »	»	rosso torb.	rosso torb.	rosso torb.	»
4	» » » » 4 » »	»	»	»	»	»
5	» » » » 6 » »	»	»	»	»	»
6	» » » » 8 » »	»	rosso viola	rosso viola	rosso viola	rosso viola
7	» 8.5 » » 15 » »	rosso viola	rosso torb.	rosso torb.	giallo torb.	giallo torb.
8	» 8 » » 20 » »	rosso torb.	giallo torb.	giallo torb.	»	»
9	» 7 » » 35 » »	»	»	»	»	»
10	» 6 » » 3 cmc. » »	giallo	»	»	»	»
11	» 4 » » 5 » » »	»	»	»	»	»

Resta pertanto da queste esperienze assodato che, analogamente a quello che Salkowski e Bleisch avevano visto per i nitriti e che io ho potuto in parte rivedere e confermare, l'*eccesso di indolo in un liquido che può anche essere un liquido culturale, porta o a far mancare del tutto la reazione del nitroso-indolo o per lo meno a renderne l'esito positivo così fugace da poter benissimo sfuggire all'attenzione di un osservatore non prevenuto di questa possibilità.*

Ond'è che riassumendo e ritornando al punto da cui ho preso le mosse, al quesito propostomi, *il venire a mancare della reazione del rosso in quei saggi alla Schottelius nei quali 24 ore avanti l'esito della ricerca era stato constatato positivo, può esser dovuto se non al consumo e alla scomparsa dei nitriti per opera degli altri germi viventi in simbiosi col vibrione colerigeno (la ricerca era negativa anche dopo l'aggiunta di nitrito potassico) almeno o all'azione dell'acido solfidrico di cui in saggi di tal genere è sempre cospicuo lo sviluppo, o all'eccesso di nitriti ottenuto magari con l'addizione di nuove e sempre crescenti quantità di nitrito potassico alle culture, o all'eccesso di indolo in seno alle culture stesse formatosi per opera e del vibrione del colera, e degli altri germi capaci di dar luogo alla sua produzione.*

Risalendo poi dal fatto specifico, all'esame generale della quistione dirò che il concetto d'eccesso di nitriti » o di « eccesso di indolo » non va preso in un senso rigorosamente assoluto, ma in senso relativo; non si può dire, cioè: questa è la quantità di nitrito, e questa è la quantità di indolo che non può essere oltrepassata senza correr rischio di compromettere l'esito della reazione, mentre invece si può constatare che la stessa quantità di nitrito può essere deficiente, ottima, o eccessiva, a seconda che varia nella soluzione in cui essa si trova la quantità dell'indolo presente, e viceversa.

Io non ho a questo riguardo che da richiamare l'attenzione sul fotogramma della fig. 4, tav. VI, in cui è ritratto l'esito della seguente esperienza all'uopo eseguita:

Sono 15 prove distribuite in tre gruppi A, B, C; nel primo gruppo sono 5 tubi da saggio contenenti 1 cmc. ciascuno di soluzione di nitrito potassico 1 $^{\circ}/_{\circ\circ\circ}$, nel secondo altri 5 con 2 cmc., e nel terzo altri 5 ancora con 3 cmc. della stessa soluzione di nitrito; nei 5 tubi di ogni gruppo sono aggiunte parallelamente quantità crescenti di soluzione di indolo (1, 5, 10, 15, 30 gocce); acqua distillata fino a 10 cmc.; e in definitiva acido solforico nella solita quantità (4 gocce).

Il fotogramma è stato eseguito dopo 16 ore dall'inizio della reazione, e da esso vediamo che mentre fra i saggi del primo gruppo il massimo d'intensità si ha con 5 gocce d'indolo, in quelli del se-

mi piace accennare che *nell'unico caso di diarrea verde che ho potuto osservare*, con presenza di muco e di sangue e con gravi sintomi d'intossicazione che determinarono la morte, *non mi fu possibile isolare germi cromogeni*, ma ebbi quel solito reperto che era abbastanza frequente per gli altri diarroici nella stessa epoca.

Il germe al quale il più delle volte venne data la parte principale nella etiologia delle diarree infantili fu il *b. coli*, questo abituale saprofita dell'intestino, che potrebbe arrivare nell'organismo in istato di esaltata virulenza. Con questo però non è da negarsi che bene spesso sono gli stessi abituali commensali dell'intestino che, in condizioni speciali, forse dovute all'alimentazione, secondo Marfan (6), acquistano una forte virulenza; anche Lesage e Macaigne (7) constatarono che le diarree semplici danno al *b. coli* saprofita una notevole virulenza.

In epidemie osservate in Roma ricordo come il Rossi-Doria (8) nel 1892 ed il Valagussa (9) nel 1899-900, trovarono il *b. coli* nei numerosi casi studiati, i quali si presentavano clinicamente col quadro dell'enterite follicolare.

Poco prima delle ricerche del Valagussa, Escherich (10) aveva già richiamato l'attenzione su questa forma diarroica dei bambini, riferibile ad una enterite follicolare, decorrente con sintomi dissenteriformi, che l'A. chiamò *coli-colitis* o *colitis contagiosa*, e nella quale era possibile isolare solamente il *b. coli*.

Le ricerche del Valagussa, constatanti la presenza anche in Italia di tale forma dissenteriforme, confermano pure l'importanza primaria del *b. coli* nella sua etiologia; ma di più l'A. richiama l'attenzione sul fatto che il *b. coli*, che egli ha costantemente isolato in 56 casi, e spessissimo in coltura pura, pur presentando i caratteri morfologici e culturali che lo assimilano al *b. coli commune*, presenta però proprietà biologiche tali, in ispecie rispetto alla tossicità delle tossiproteine e all'azione agglutinante del siero degli ammalati, che dal *b. coli commune* lo differenziano.

Boocker e Roger (11) riscontrarono pure il *b. coli*, Boocker anche associato al *b. lactis aërogenes*. Anche il Nobécourt (12) trovò il *b. coli*, má affermò l'importanza delle associazioni batteriche e rilevò come la concomitanza di speciali streptococchi esaltasse la virulenza del *b. coli*.

Questi streptococchi, o meglio diplococchi. furono pure non infrequentemente trovati nelle feci diarroiche dei bambini, e, per quanto ospiti abituali, è possibile che abbiano una certa importanza nella etiologia delle enteriti infantili (Escherich, Nobécourt, Thiercelin).

Germi che per qualche carattere si differenziano dal *b. coli commune*, ma a questo riportabili, furono riscontrati da vari AA., ma in modo troppo incostante per potere ascrivere a questi *b. coli* atipici, d'altronde diffusissimi in natura e nell'intestino normale, una qualsiasi parte etiologica.

Invece un germe, appartenente al gruppo del *b. coli*, ma dal *b. coli commune* differenziantesi per qualche importante carattere biologico e che per la sua costante presenza nei casi studiati, merita una importanza etiologica, è quello che il Volpino (13) isolò l'anno scorso in 18 casi di diarrea estiva infantile a Torino. Questo germe che l'A. denomina *b. enteritidis infantum*, si differenzia dal *b. coli* perchè non coagula il latte, non attacca il lattosio e non produce indolo. Esso viene agglutinato specificamente dal siero dei bambini ammalati.

Molto simile a questo germe è quello descritto dal Sukehito (14), come reperto costante nell'Ekiri, malattia infantile del Giappone che si presenta coi sintomi di un'enterite follicolare; anch'esso si differenzia dal *b. coli commune* perchè non coagula il latte e perchè non produce, o solo tardivamente, indolo.

Nell'etiologia delle diarree dei bambini può certo talora avere importanza anche il *b. lactis aërogenes;* anzi, secondo Escherich (15), esso, forse più del *b. coli,* può in condizioni speciali esserne la causa acquistando una notevole virulenza.

Un buon numero di diarree estive che si osservano nei lattanti, tenuti al poppatoio, si spiega certamente con l'azione nociva esercitata dal latte alterato per opera di microorganismi e specialmente, secondo Flügge (16) per opera di germi anaerobici o appartenenti al gruppo del *b. subtilis,* capaci di peptonizzare il latte in tal modo da dare origine a fenomeni colerosi.

Anche il Tedeschi (17) dà una grande importanza alla presenza delle spore del *b. subtilis* nel latte vaccino destinato all'alimentazione dei bambini. In altri casi è il *b. enteritidis* di Gärtner che può essere incolpato di alcune forme diarroiche infantili, anche a carattere epidemico. Recentemente il Tissier (18) richiamò l'attenzione sull'importanza, nella etiologia delle diarree infantili, della flora anaerobica intestinale. Questa nell'intestino dei bambini diarroici è rappresentata da varie specie (*b. perfringens, b. saccharobutyricus, b. III* di Rodella, *coccobacillus perfoetens, streptococcus parvulus*). In tutte le diarree l'A. riscontrò costantemente il *b. perfringens* dotato di forte azione proteolitica e fortemente patogeno ed a esso l'A. ripete l'etiologia della malattia. Questo germe fu d'altronde descritto come causa di enterite anche da Klein e Andrewes sotto il nome di *b. enteritidis sporogenes.*

In questi ultimi anni non pochi AA. sopratutto americani, riscontrarono nelle feci di bambini affetti da diarrea estivo-autunnale, germi appartenenti al gruppo dei *b. dissenterici.* Duval e Basset (19) in 42 casi di diarrea infantile trovarono un b. identificabile col *b. dysentericum* tipo Shiga. Hiss e Russel (20), pure nelle diarree infantili, riscontrarono un germe molto simile (*b.* Y degli AA.). Martha Wollstein (21), in 32 casi di diarrea infantile sopra 140 casi studiati a New-York, isolò un dissenterico del tipo isolato da Flexner nelle Filippine. Flexner (22) dimostrò come il *b. dysentericum* può essere isolato dalle feci e dalla mucosa intestinale in un gran numero di bambini affetti da forme diarroiche specialmente se a tipo dissenteriforme: più di frequente è il tipo Flexner var. Manilla che si isola, più di rado il tipo Kruse-Shiga, però talora le due varietà possono essere associate, e talora si riscontrano anche delle varietà leggermente differenziabili, specialmente in rapporto ai poteri fermentativi, dai tipi accennati.

Duval e Shorer trovarono il *b. dysentericum* nel 94 % dei 79 casi di diarrea estiva studiati (58 volte var. Manilla, 11 volte var. Shiga: 5 volte le due varietà associate); la Wollstein trovò pure il *b.* di Flexner var. Manilla in 47 casi su 52 di bambini diarroici. Cordes studiando 26 casi di disturbi intestinali nei lattanti trovò in 25 il tipo Flexner (23).

In America adunque nelle diarree infantili estivo-autunnali è facile riscontrare la presenza del *b. dysentericum,* sopratutto nella varietà isolata da Flexner nelle Filippine che e dal tipo Kruse-Shiga si differenzia, come è noto, per la proprietà di fermentare la mannite e perchè produce indolo.

Batteri dissenterici furono riscontrati nei bambini diarroici anche in Europa. Leiner (24) a Vienna in 7 casi di bambini diarroici, di cui alcuni col quadro della enterite follicolare, isolò un germe del tipo Flexner. Recentemente Dopter (25) comunicò alla Società medica degli ospedali di Parigi, che su 11 casi di diarrea semplice, ma ad andamento dissenteriforme, isolò due volte il *b. dysentericum* ed in quattro casi osservò un forte potere agglutinante del siero degli ammalati sul *b. dysentericum*. Auché e Campana nelle diarree mucose e muco-sanguinolenti dell'infanzia riscontrarono dei germi dissenterici (tipo Shiga e tipo Flexner-Manilla) (52).

Materiale d'esame.

Ho esaminato batteriologicamente le feci di 48 bambini, affetti da forme diarroiche più o meno gravi, dei quali 24 nell'autunno 1904 e 24 nell'estate 1905. Buona parte del materiale ho raccolto nell'ambulatorio pediatrico « Soccorso e Lavoro »; alcuni casi mi furono favoriti dal dott. Federici e appartengono alla sua clientela privata. Quasi tutti i bambini presentavano diarrea a tipo dissenteriforme; l'età variò fra pochi mesi e tre anni di vita: l'alimentazione, anche per i lattanti, per tutti i casi, era mista ed in generale anzi l'alimento che più difettava era il latte.

I casi osservati, tanto nell'autunno quanto nell'estate, presentarono un quadro sintomatico nelle linee generali abbastanza conforme, con differenze riguardanti solo l'entità dei sintomi e la durata del decorso. Mi è quindi possibile, senza riportare la storia di tutti i 48 casi, riassumerle tutte in un quadro sintomatico tipo.

Il bambino talora a un tratto, talora con un precedente periodo di malessere, vien colpito da diarrea con frequenti scariche liquide, vischiose, giallo-chiare, quasi inodore, senza traccie di residui alimentari, con muco e sangue.

In breve tempo si stabiliscono condizioni più gravi: tenesmo continuo con fuoruscita di zaffi mucosi striati di sangue, talora anche di coaguli sanguigni; di rado ebbi ad osservare anche delle vere enterorragie. Il numero delle evacuazioni, limitato per alcuni casi a 6-8 *pro die*, può arrivare talora anche a 30-40 nelle 24 h., qualche volta anzi i dolorosi premiti sono quasi continui e l'emissione di scarsa quantità di muco soffuso di sangue ininterotta. L'addome è dolente alla palpazione; il bambino dimagra rapidamente, piange ad ogni tratto; compaiono i primi sintomi della intossicazione e si osservano elevazioni termiche specialmente serotine. A questo punto, sotto una cura vigilante, a poco a poco le condizioni normali si ristabiliscono, ma lentamente e con facili aggravamenti e recidive.

In altri casi le condizioni si aggravano sempre più, il dimagramento progredisce, il polso si fa filiforme, le estremità algide, i sintomi di intossicazione sempre più impellenti, sin che il bambino soccombe. Dei 48 casi studiati tre furono mortali; ben pochi quelli in cui si aveva il quadro di una diarrea banale, ma nei quali precedentemente si era osservato emissione di muco e di sangue.

Evidentemente quasi tutti i bambini da me osservati erano affetti da quella forma diarroica che Escherich denominò *coli-colite* e che si manifesta anatomo-patologicamente sotto forma di enterite follicolare e che per i sintomi e per il decorso ben si può denominare *enterite dissenteriforme*.

L'aspetto delle feci è sopratutto caratteristico: emesse di continuo, ma in piccola quantità, presentano per lo più l'aspetto di masse vischiose composte di fiocchetti di muco striati di sangue, talora galleggianti in scarso liquido giallognolo. All' esame microscopico, se nei primi giorni è possibile riscontrare qualche residuo alimentare, ulteriormente non si osserva che una stragrande quantità di germi per lo più a forma batterica, taluni anche a forma coccica, delle emazie mal conservate e bene spesso dei leucociti per lo più polinucleati, talvolta in quantità enorme.

Tecnica degli isolamenti colturali.

Volendo anche indagare l'eventuale presenza di germi appartenenti al gruppo dei dissenterici, scelsi quel terreno che meglio mi prometteva una facile distinzione rispetto al *b. coli*, e la scelta non poteva essere dubbia dopo che numerosi AA. avevano dimostrato la superiorità dell'agar Drigalski-Conradi nell' esame batteriologico delle feci. Questo terreno rappresenta certo un notevole progresso nei mezzi tecnici sinora a nostra disposizione, per quanto esso non rappresenti ancora l'ideale. Gli si rimprovera il fatto che lascia vegetare sotto forma di colonie tifosimili buon numero di germi e il Monti (26) ne dà una lunga lista; gli si rimprovera pure, e non a torto, che quando il *b. coli* sovrabbondi riesce difficilissimo scoprire la presenza di colonie dovute a b. tifosi o dissenterici, che sono più tardive e vengono mascherate dal diffuso arrossamento dovuto al *b. coli*. Un terzo inconveniente, citato dal Monti, è che il lattosio nella bollitura può scindersi in galattosio ed in glucosio, zucchero che com'è noto può essere attaccato con produzione di acidi anche da parte del *b. typhi*.

Questi inconvenienti non ebbi però mai ad osservare; è facile ovviare al diffuso arrossamento dovuto al *b. coli* facendo le semine su una discreta serie di piastre; il fatto poi che sul terreno del Drigalski altri germi vegetano sotto forma di colonie tifosimili, rappresentava per me non un'inferiorità, ma un beneficio, in quanto io volevo rivolgere l'attenzione anche a germi similcoli o simildissenterici o similtifici o d'altra natura eventualmente presenti.

La prelevazione del materiale venne sempre fatta mediante tubetti sterili, i quali, dopo immersione in olio sterilizzato, venivano introdotti nel retto.

Dal materiale così prelevato, quand'era possibile, si pescava un piccolo fiocchetto muco-sanguigno e, dopo averlo lavato in brodo sterile, si strofinava su una serie di piastre contenenti agar del Drigalski-Conradi, usufruendo per l'isolamento di quelle piastre che mostrassero ben isolate le colonie. Se le feci erano molto liquide si seminavano con la spatola del Drigalski o con un robusto ago di platino a squadra. Nelle prime serie di ricerche in taluni casi passai prima il materiale attraverso i brodi fenicocloridrici, preoccupato di eliminare il più possibile banali germi, ma ben presto mi convinsi che tale espediente era inutile perchè anche seminando direttamente sul terreno del Drigalski non ebbi mai sviluppo di germi banali, non sarcine, non fluorescenti, non sporigeni del gruppo del *b. subtilis*; ottenni è vero, qualche volta, dei protei, ma questi od in cultura pura od in tale quantità che dimostrava che in quei casi la flora intestinale era davvero rappresentata esclusivamente o quasi dal *b. vulgare*. Solo in tre casi osservai qualche scarsa colonietta bluastra dovuta a un micrococco fluidificante la gelatina.

L'assenza di germi banali nelle mie ricerche più che dalla bontà del terreno dipende certamente dalle condizioni della flora batterica che io studiava; infatti usando lo stesso terreno, il dott. Majone (27) nelle sue ricerche batteriologiche sulle urine dei tifosi, ebbe abbastanza spesso ad incontrarsi con sarcine, fluorescenti, protei e micrococchi. È adunque certo che la flora intestinale dei bambini diarroici si modifica in modo che solo una o poche specie rimangono a rappresentarla.

L'isolamento delle colonie veniva fatto entro le 24 h., prolungando però l'osservazione delle piastre per 2-3 gg. per sorvegliare, se del caso, l'evoluzione di qualche colonia tardiva; in genere però non è prudente protrarre l'isolamento oltre il 1° giorno perchè se il *b. coli* abbonda è facile l'arrossamento diffuso; se poi si ritarda ulteriormente l'osservazione non è raro osservare che le piastre pure di *b. coli*, che nelle 24 h. avevano dato arrossamento in toto, dopo 2-3 gg. si presentano uniformemente bluastre per successiva produzione di sostanze alcaline. Un altro fatto importante, che quasi costantemente ebbi ad osservare, è, che facendo gli isolamenti entro le 24 h. colonie azzurre mi diedero lo sviluppo di tipici *b. coli*. In quasi tutte le piastre infatti osservavo accanto alle colonie rosse altre azzurre, ma che per la rapidità di sviluppo e la grandezza non si potevano confondere con colonie di *b. typhi* o di *b. dysentericum*. I germi isolati da queste colonie si comportavano però come tipici *b. coli*: coagulavano il latte, coagulavano producendo gas e arrossando il terreno di Klopstock, e riportati, dopo l'isolamento, sullo stesso terreno del Drigalski lo arrossavano, più o meno rapidamente. Una spiegazione del fatto però, per alcuni di questi germi ho potuto avere seminandoli in brodi lattosati e laccamuffati. Mentre i *b. coli* isolati da colonie rosse acidificavano tale terreno già nelle 12 h. *buona parte dei b. coli isolati dalle colonie azzurre acidificarono solo dopo 3-4 gg.* Alcuni però si comportarono come i *b. coli* isolati da colonie rosse e ciò dimostra che germi di primo isolamento, se possono essere deficienti rispetto a qualche proprietà biologica, le possono però riacquistare subito sottoposti alle solite condizioni colturali.

Furono fatti circa dieci isolamenti per caso scegliendo proporzionalmente colonie rosse e colonie azzurre. La diagnosi del germe isolato si fondava sui soliti caratteri microscopici e culturali, sui caratteri biologici sopratutto in riguardo all'azione proteolitica (indolo e triptofane) ed all'azione sugli idrati di carbonio (glucosio, lattosio, maltosio, mannite, saccarosio, amigdalina).

Studio morfologico e biologico dei germi isolati.

Le specie batteriche isolate furono scarse; naturalmente isolai più di frequente il *b. coli* o germi del gruppo *b. coli*; in un caso solo ed in coltura pura il *b. lactis aërogenes*, in pochissimi casi sia in coltura pura, sia associato col *b. coli*, il *b. vulgare*; inoltre nella metà dei casi studiati nell'autunno del 1904, riscontrai in associazione col *b. coli* un cocco non fondente la gelatina identificabile con l'*enterococco* di Thiercelin.

B. vulgare. Fu isolato in tre casi in coltura pura, in due in simbiosi col *b. coli*. Presenta i comuni caratteri descritti dagli AA., ma mi fallì sempre la ricerca dell'indolo.

B. lactis aërogenes. Isolai questo germe in un unico caso, il quale anche clinicamente si differenziava dagli altri casi, da una piastra del Drigalski completamente arrossata nella quale avevo seminato delle feci giallo oscure, puzzolenti, con qualche traccia di muco e senza sangue. Sulla piastra il germe si trovava in coltura pura. Per i caratteri morfologici e culturali male si distingue dal *b. coli*, solo che si presenta sotto forma di bastoncini più lunghi, meno tozzi; inoltre, ma non costantemente, le culture acquistano un carattere filante. Coagula rapidamente il latte entro le 12 h. con separazione di siero limpido e spaccando il coagulo con molteplici fenditure di gas; attacca con produzione di acidi e di gas il glucosio, il lattosio, il maltosio, la mannite, il saccarosio; produce gas dalla glicerina; non attacca l'amigdalina; non produce indolo, ma sino dai primi giorni in brodo peptonizzato dà una netta reazione proteinocromica. Questo germe si differenzia dal *b. coli* per la sua immobilità e per la mancanza di produzione di indolo, per il fatto che le sue culture bene spesso si presentano mucose e perchè nell'organismo si presenta di frequente capsulato. Per cui esso più che al gruppo del *b. coli* appartiene forse al gruppo dei *b. capsulati* o *mucosi* di cui prototipo è il *b. pneumoniae* Friedlaenderi al quale anzi Grimbert e Legros (28) lo identificano, per quanto la maggior parte degli stipiti del *b. pneumoniae* non abbiano azione coagulante sul latte.

Enterococco. Nella metà dei casi studiati nell'autunno del 1904, isolai in associazione col *b. coli* un cocco identificabile coll'*enterococco* del Thiercelin (29).

Prima del Thiercelin questo germe era però già stato descritto dell'Escherich (30) nelle feci dei lattanti sotto il nome di *streptococcus enteritidis*, ma l'A. afferma la variabilità di questo germe forse per condizioni ambienti. Gli stipiti da me isolati presentavano invece caratteri conformi fra di loro e tali da permettere di considerare questo germe come un'entità a sè, con caratteri ben netti che lo differenziano dai comuni streptococchi e diplococchi dell'intestino (*diplostreptococcus intestinalis* del Tavel identificabile con lo *streptococcus brevis* del Lingelsheim). L'enterococco sembra essere ospite abituale dell'intestino dei lattanti, ma nelle condizioni normali l'isolamento riesce difficile od impossibile, mentre nelle alterate condizioni del tubo enterico si moltiplica in tal modo che non solo riesce facile ad isolarlo, ma anche ad un semplice esame microscopico delle feci si osserva che ben spesso esso costituisce la maggior parte della flora. Non credo inopportuna une breve descrizione dell'enterococco, quale io ebbi ad osservarlo, perchè il più delle volte fu dagli AA. trascurato, forse confondendolo con i comuni streptococchi.

Morfologia. — Nelle feci ed in coltura l'enterococco si presenta sotto forma di diplostreptococchi con notevole pleomorfismo. I singoli elementi sono o rotondi, od ovali, talora a forma nettamente lanceolata, riuniti a coppie od a corte catene al massimo di 6–8 elementi. In uno stesso campo microscopico è possibile osservare aggruppamenti svariati: coppie di cocchi rotondi o ovali, che talora ricordano perfettamente il diplococcus lanceolatus, coppie che ricordano il tipo gonococco; catene di elementi rotondi, altre di elementi allungati, altre ancora di elementi ovali che si dispongono col loro maggior diametro parallelamente. Il pleomorfismo è ancora più evidente nelle culture su patate e facendo dei preparati da queste si osserva bene un alone chiaro che circonda le singole coppie. Abituato ai comuni terreni, dopo una lunga serie di passaggi, il germe morfologicamente poco si rende dissimile da un comune *streptococcus brevis* (Flugge).

Il Thiercelin fece delle interessanti osservazioni morfologiche su questo germe, e osservò che il protoplasma batterico, circondato da un alone chiaro si differenzia in quattro settori (macchie centrali) separati fra di loro da uno spazio chiaro. Colorando progressivamente con l'emateina si vedono a poco a poco comparire fra l'alone ed il protoplasma delle piccole granulazioni periferiche. È immobile, resiste al Gram; si coltiva con estrema facilità anche in assenza di ossigeno e anche a temperatura ambiente, sviluppandosi rapidamente. Resiste a lungo; io l'ho trovato vitale in colture di più di tre mesi ed il Thiercelin ebbe culture feconde anche dopo anni.

Caratteri colturali. — Non liquefa la gelatina e vi si sviluppa con un nastrino delicato senza sviluppo in superficie. Intorbida da prima il brodo che

dopo 24-48 h. si fa limpido, mentre al fondo si deposita un soffice fiocco biancastro. Per strisciamento su agar si sviluppa per lo più sotto forma di piccole coloniette bianche, trasparenti, che di rado confluiscono in una delicata patina velamentosa. L'acqua di condensazione rimane limpida. Su patata si sviluppa rigogliosamente, ma non in modo visibile.

Le colonie in gelatina si presentano ad occhio nudo come piccole gocce di rugiada, all'ingrandimento di 60 diametri si osservano colonie superficiali rotonde o subrotonde e profonde a cote, a margini netti, finissimamente granulose, trasparenti o bianco-grigiastre. Lo stesso aspetto presentano le colonie in agar, solo che talune prendono una colorazione giallognola.

Caratteri biologici. — Non ha fermento proteolitico: non fluidifica la gelatina, non produce nè indolo, nè triptofane; coagula il latte in tempo variabile fra le 24 h. e gli 11 gg., a seconda degli stipiti, ma con coagulo molle, limitato al fondo della provetta, senza che il liquido soprastante si alteri nell'aspetto e nella sua reazione alcalina. Non produce gas in presenza di glicerina, glucosio, lattosio, maltosio, mannite, saccàrosio; non scinde l'amigdalina.

Secondo il Tissier (31) sdoppia l'urea e produce fermentazione acida del glucosio, lattosio e saccarosio. Invece nessuno degli enterococchi da me studiati, come del resto osservò il Thiercelin, produsse acidi in terreni glucosati e lattosati usando come indicatore la laccamuffa. Anche sul terreno del Drigalski le colonie restano azzurre e molto simili a quelle del *b. typhi*, solo che mentre queste in seguito si espandono alcun poco, le colonie dell'enterococco rimangono sempre piccole e rugiadose.

Osservazioni sui germi isolati appartenenti al gruppo del b. coli.

Nelle mie ricerche, com'era presumibile, trovai più frequente il *b. coli*; non però in modo costante perchè in 4 dei 48 casi studiati esso faceva difetto ed era sostituito in cultura pura tre volte dal *b. vulgare* ed una volta dal *b. aërogenes*. Negli altri casi riscontrai sempre il *b. coli* od almeno dei similcoli, e trattandosi di associazione, erano sempre le colonie del *b. coli* quelle che preponderavano, eccezione fatta di qualche caso nel quale il germe associato era rappresentato dall'Enterococco. I vari stipiti isolati studiai comparativamente, facendo anche confronti fra stipiti isolati dallo stesso individuo e questo costantemente in ogni caso, allo scopo di vedere se nell'intestino diarroico fosse così frequente, come nell'intestino normale, isolare dallo stesso individuo varietà più o meno differenziabili dal tipico *b. coli*.

Il mio studio comparativo fu fatto per i caratteri principali su 166 stipiti e di questi 90 furono studiati anche con ricerche differenziali più delicate. Pochissimi si dimostrarono atipici non avendo azione sul lattosio; gli altri presentarono i seguenti caratteri.

Caratteri morfologici-colturali. — Rispondono a quelli noti per il *b. coli commune.* Notevole il pleomorfismo del *b. coli*, dalle forme coccobatteriche e diplococciche, specialmente quando l'isolamento veniva praticato attraverso i brodi Parietti, alle forme filamentose. Non poche volte osservai una distinta colorazione polare e in modo sempre costante per uno stipite, il che invalida l'affermazione del Migula e dell'Artaud che vogliono tale colorazione caratteristica per il *b. typhi.*

Frequente fu la formazione di velo nelle brodocolture e frequentissima quella di un collaretto aderente alle pareti, ma a questo riguardo i vari stipiti si comportarono volta a volta in modo diverso. Su patate tutti diedero luogo ad una patina spessa, umida, grassa, lucida, da prima bianco-sporca e poi giallo-brunastra, nè mai mi incontrai con qualche *b. coli* che sotto questo punto di vista fosse tifosimile.

Osservai sempre per tutti gli stipiti sviluppo di sole colonie opache in gelatina, talora a struttura concentrica, rotonde o subrotonde, a margini netti. Le colonie trasparenti non ebbi ad osservarle, ma in scarso numero, che lungo tempo dopo l'isolamento. Solo nei *b. coli* passati per più volte attraverso l'organismo degli animali da esperimento il rapporto fra colonie opache e trasparenti si invertiva e per taluni stipiti alcune di queste presentavano l'aspetto a foglia di fico con scarse però e poco evidenti venature.

Caratteri biologici — Movimento. — Non è facile stabilire se un *b. coli* di recente isolato sia mobile o no; ma un' attenta e prolungata osservazione eseguita in diverse condizioni di coltura, di età, di temperatura mi permette di affermare che tutti i *b. coli* da me isolati erano dotati di mobilità. Solo che mentre alcuni si dimostrano facilmente mobili, anche subito dopo l'isolamento, altri acquistano la mobilità solo dopo ripetuti passaggi, mentre certi stipiti mobili nelle prime culture diventano immobili nelle successive. Per alcuni stipiti poi è necessario sorprendere la mobilità in un dato tempo dalla semina fatta; così germi immobili dopo le 24 h., si presentano invece mobili alla 6ª-12ª h. Anche il grado di mobilità è variabilissimo; vi sono stipiti che possiedono un movimento pari a quello del *b. typhi*, altri che si muovono pigramente; altri ancora nei quali la mobilità è posseduta solo da scarsi individui. Stipiti isolati dallo stesso individuo si comportano in modo variabilissimo.

Coagulazione del latte. — Per la maggior parte degli stipiti avviene entro le 12-24 h.; talora però può ritardare sino al 5° g. In genere la coagulazione avviene *in toto* con separazione di siero limpido, mentre il coagulo presenta qua e là di frequente delle fenditure; per taluni *b. coli* però la coagulazione avviene a masse frammentate ed in questo caso la parte liquida rimane torbida. Nelle prime culture di isolamento qualche *b. coli* può ritardare la coagulazione fino a 15-20 gg: nei successivi passaggi poi si comporta come un tipico *b. coli.* Anche rispetto a questa proprietà stipiti isolati dallo stesso individuo si comportano in modo diverso sia rispetto al tempo necessario per la coagulazione sia per l'intensità della stessa.

La coagulazione della caseina da parte del *b. coli* era dovuta alla produzione di acidi per scissione del lattosio; infatti mentre tutti gli stipiti coagulavano il terreno di Klopstock, non osservai mai coagulazione nelle semplici soluzioni di nutrosio.

Reazione indolica. — Se si saggia con una delle reazioni note la presenza d'indolo nelle brodo-colture di 7 gg. di stipiti di *b. coli* di recente isolati,

anche se provenienti dallo stesso individuo, è facile osservare che mentre alcuni stipiti danno istantanea una netta reazione indolica, altri si dimostrano anindolici. Ma buona parte di questi nei successivi passaggi danno la reazione indolica, ed a me fu possibile dimostrarla col metodo Salkowski in tutti gli stipiti studiati, solo che per alcuni fu necessario ricorrere all'estrazione dell'indolo con alcool amilico oppure alla modificazione proposta dal Nencki. Inoltre per certi stipiti la produzione di indolo non è affatto costante nè per il tempo in cui la reazione può essere dimostrabile, nè per la sua presenza, tanto che è lecito esitare di fronte all'importanza diagnostica che alcuni vogliono ascrivere a questa reazione. Ma d'altra parte posso anche affermare che tutti i *b. coli* isolati dalle feci diarroiche dei bambini sono capaci di produrre indolo. Nessuno invece fu capace di dare la reazione indol-nitrosa.

Reazione del triptofane. — Secondo Erdmann e Winternitz (32) la reazione del triptofane o proteinocromica sarebbe un'importante reazione colorata differenziale fra *b. typhi* e *b. coli*, perchè, secondo gli AA., mentre il *b. typhi* dà tale reazione già in 2ª giornata e non produce mai indolo, il *b. coli* produce indolo già nelle prime 24 h. e non dà mai la reazione triptofanica.

A parte che io ho riscontrato dei tipici *b. typhi* incapaci, almeno nella prime colture di isolamento, di produrre triptofane, l'affermazione degli AA. non può essere accettata in senso assoluto, perchè, sui vari stipti di *b. coli* da me saggiati, cinque in modo costante ed uno in modo incostante mi diedero, contemporaneamente alla reazione indolica, anche la proteinocromica. Questi sei stipiti triptofanici furono isolati da cinque individui insieme ad altri stipiti non dotati di tale proprietà e non sono per altri caratteri differenziabili affatto dal *b. coli commune* (33).

Azione sugl'idrati di carbonio. — Saggiai l'azione dei vari stipiti, sia rispetto alla produzione di acidi, sia rispetto alla produzione di gas, in terreni con aggiunta di glucosio, lattosio, maltosio, mannite, saccarosio e ricercai anche l'azione fermentativa di essi sull'amigdalina. Usai in genere dei terreni liquidi costituiti di acqua peptonizzata e salata (risp. 1 e 0,5 %) con l'1 % di zucchero e laccamuffati, distribuiti in comuni provette nelle quali è bene spesso evidente anche la produzione di gas. Solo nei casi dubbi e negativi ricorsi alle provette di fermentazione ed alla semina in agar zuccherato.

Nei terreni glucosati. — Per tutti gli stipiti la produzione di gas e di acido avviene rapidamente nelle 24 h.; si osservano solo gradazioni d'intensità.

Nei terreni lattosati si ha produzione di gas e di acido per tutti gli stipiti. Alcuni però dopo una netta acidificazione visibile già nelle 24 h. ritornano in 5ª-10ª giornata il terreno alla colorazione bluastra primitiva, il che ci spiega il fatto già accennato che alcune piastre del Drigalski-Conradi, dopo un completo arrossamento, in capo a 4-5 gg. presentavano una netta alcalinizzazione.

Per altri stipiti, di recente isolamento, l'arrossamento del terreno si aveva solamente in 3ª-4ª giornata ed erano appunto quelli che erano stati isolati da colonie bluastre sul terreno Drigalski-Conradi.

Nei terreni maltosati si ha produzione di gas e di acidi per tutti gli stipiti, eccezione fatta di uno solo che acidifica solamente. La reazione acida è netta fra le 24 e le 48 h.; per alcuni però è debolissima.

Nei terreni manninati si ha pure produzione di gas e di acidi per tutti gli stipiti, eccezione fatta di uno stipite che produce solo acidi ed è lo stesso che si comporta in ugual modo nei terreni con maltosio. Per taluni stipiti la reazione acida è leggerissima e per tutti, fatta eccezione di tre soli, l'arrossamento scompare verso il 4°-5° g. e ricompare la colorazione bluastra.

Nei terreni saccarosati è noto che il *b. coli* si comporta in modo diverso a seconda degli stipiti. Parck (34) studiando comparativamente 44 stipiti ne trovò la terza parte incapace di produrre gas in terreni saccarosati.

Durham chiamò *var. communior* il *b. coli* che si distingue dal *b. coli commune* di Escherich solamente perchè si comporta come fermento acido rispetto al saccarosio. Il Tissier (35) ritrovò rarissima questa varietà nelle feci dei bambini diarroici; io invece l'ho ritrovata abbastanza frequentemente; infatti i *b. coli* isolati nella I[a] serie di ricerche producevano acidi e gas in terreni saccarosati nella proporzione del 41 °/₀, quelli isolati nella II[a] serie produssero tutti acidi e gas dal saccarosio, eccezione fatta di 4 stipiti. Constatai come le due varietà possono coesistere nello stesso individuo.

Terreni con amigdalina. — Questo glicoside sotto l'azione dell'emulsina o dell'attività vitale dei germi, viene scisso in glucosio, in olio di mandorle amare ed in acido prussico, e la scissione è facilmente rilevabile all'odorato.

Questa scissione si ottiene ogni qualvolta si mescoli una piccola porzione di feci a terreni liquidi amigdalinati; per contrario rari sono gli stipiti di *b. coli* capaci di produrla ed io ne ho trovati solamente otto dotati di tale proprietà.

Dal sopra esposto non rimane dubbio che il germe da me isolato in predominanza è il *b. coli* rispondente per i suoi caratteri al *b. coli commune* di Escherich. Noto però come buona parte degli stipiti isolati, per l'azione loro sul saccarosio, va piuttosto ascritta alla varietà *communior* di Durham.

B. coli atipici. — Ne isolai rarissimi stipiti, i quali dal *b. coli* tipico si differenziano perchè non attaccano il lattosio. Riassumo in una tavola i caratteri biologici presentati da questi germi:

Stipiti	Mobilità	Latte	Indolo	Triptofane	Glucosio		Lattosio		Maltosio		Mannite		Saccarosio	
					Acido	Gas	Acido	Gas	Acido	Gas	Acido	Gas	Acido	Gas
A	—	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—
B	+	Coagulo molle dopo 18-20 gg.	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—
C	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—
D	+	—	+	—	±	—	—	—	+	—	+	—	—	—
E	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—

Nessuno scinde l'amigdalina.

Germi incapaci di fermentare il lattosio, ma ascrivibili per tutti gli altri caratteri al gruppo del *b. coli* furono descritti da vari AA., ed a essi appartengono quelli isolati dal Volpino e dal Sukehito. Il Matzuschita parla di un *b. coli proximum*, che si differenzia dal *b. coli commune* solo perchè non coagula il latte. Hermann e Wurtz descrivano sotto il nome di *b. coli tiphimorphum* quei *b. coli* che non hanno alcuna azione sul lattosio, non coagulano il latte, dànno appena traccie di indolo e formano acidi dal glucosio e dal saccarosio, varietà di *b. coli* non mai riscontrata dal Tissier nelle feci diarroiche dei lattanti, ed alla quale forse ò riportabile lo stipite *C*, che però produsse, sin dalle prime colture di isolamento, una netta reazione indolica. Gli stipiti atipici *B* ed *E*, che si differenziano fra di loro rispetto alla fermentazione della mannite, sono incapaci di attaccare il saccarosio e sino a un certo punto sono riportabili al *b. enteritidis infantum* del Volpino, dal quale però si differenziano perchè producono indolo e perchè sono dotati di scarsa mobilità. Però lo stipite *B*, che già nelle comuni provette può, sebbene in modo incostante, dare in capo a 18-20 giorni una leggera coagulazione del latte, presenta comune col germe del Volpino il fatto che, coltivato in matracci contenenti 200 cmc. di latte, coagula più rapidamente e in capo a 10 giorni determina una coagulazione *in toto* con separazione di siero citrino che alla carta di tornasole si dimostra di reazione neutra. La presenza di reazione indolica, la mancanza di quella proteinocromica non permette di identificare questi *coli atipici* col *b. enteritidis* di Gärtner o col *b. paratyphi B*, ai quali pure per altri caratteri si assomigliano. Questi tre stipiti furono isolati in associazione col *b. coli*, e rappresentavano una minima parte della flora intestinale, tanto che li posso ritenere come reperti accidentali.

Lo stipite *A*, fu isolato in associazione coll'enterococco in un gravissimo caso di diarrea dissenteriforme, nel quale la flora intestinale era rappresentata da questi soli due germi in proporzione su per giù uguale. Esso si allontana ancora più dal tipico *b. coli* perchè, pur non coagulando il latte, è dotato di un forte potere caseinolitico; infatti lo peptonizza in breve tempo con emanazione di un odore quasi insopportabile di putrefazione. Dopo un certo tempo nel latte, che presenta reazione neutra o leggermente alcalina, si può dimostrare la presenza di idrogeno solforato e di indolo, mentre non riesce la ricerca del triptofane. Nel terreno di Klopstock si comporta come un tipico *b. coli*, mentre nei terreni lattosati e laccamuffati dà luogo solo a intensi fenomeni di riduzione.

Questo germe è pochissimo o niente patogeno per la cavia ed il

coniglio, ma inoculato sottocute in forte dose nel coniglio determina in loco una tumefazione edematosa che poi si ulcera. L'ulcerazione può talora guarire lasciando in luogo un'alopecia circoscritta, ma altre volte acquista un carattere gangrenoso e si estende necrotizzando le parti viciniori fino a completo scollamento delle parti molli. In queste gravi condizioni l'animale deperisce e può morire in 15 o 20 giorni senza però che alla necroscopia alcunchè si possa osservare, salvo che le lesioni esterne.

Lo stipite *D* si differenzia ancor più dal *b. coli*, perchè attacca debolmente il glucosio senza produzione di gas. Fu isolato insieme al *b. coli* in un caso nel quale le feci presentavano un caratteristico aspetto dissenteriforme. Dal *b. coli* poco o punto si differenzia per i caratteri microscopici e colturali; solo che la sua patina su agar è meno spessa e più sfarinabile, quella su patata biancastra; nelle piastre in gelatina presenta numerose colonie supèrficiali a margini lobati con delicate venature in tutto simili a quelle tipiche del *b. typhi*. È mobile, ma la mobilità, evidente se il materiale è preso da giovani colture su agar, non si avverte invece nelle brodo-colture; produce indolo, non triptofane, non attacca il lattosio, nè il saccarosio, ma produce acidi dalla mannite e dal maltosio.

Questo germe trattato con un siero antidissenterico polivalente, ma scarsamente agglutinante, si agglutina nel rapporto 1 : 300 in capo a 5 ore, comportandosi comparativamente ai vari stipiti di *b. dysentericum* in questo modo:

B. dysentericum	Celli	$= A_1$ nel rapp. 1 : 100 ; A_5 nel rapp. 1 : 300
B. *Id.*	Manilla	$= A_1$ nel rapp. 1 : 30; 1 : 60
B. *Id.*	Kruse	$= A_1$ nel rapp. 1 : 100; A_5 nel rapp. 1 : 600
B. D....................		come il *b. dys.* Celli.

Le ricerche del Celli (36) (tipo dell'A.); quelle del Bajardi (37) e le recenti del Negri e Pane (38) (tipo Kruse) dimostrano la possibilità di riscontrare germi dissenterici anche in Italia ed era lecito domandarsi se il germe da me isolato si potesse ascrivere al gruppo dei dissenterici, ossia a quel tipo fra essi che, secondo la distinzione degli AA. americani (Park, Collins e Goodwin [39], Flexner) è capace di fermentare la mannite e di produrre indolo. A questo tipo appartengono la varietà Manilla e la varietà Celli e, con la guida dei caratteri differenziali trovati dal De Blasi nel suo lavoro comparativo sui diversi b. dissenterici (40), volli vedere a quale delle due varietà più si avvicinasse il germe isolato. La mobilità riscontrata in questo germe poteva lasciarmi dubbioso sulla possibilità di

ascriverlo al gruppo dei dissenterici, tanto più che gli stipiti Manilla e Celli conservati nella collezione dell'Istituto si erano dimostrati durante le ricerche del De Blasi, e prima e per lungo tempo dopo, costantemente immobili. Ma lo stesso Flexner (41) dice che nelle prime colture di isolamento trovò spesso mobile il suo germe, mobilità che scomparve poi nei successivi passaggi; Dunn riscontrò un *b. dys.* dotato di mobilità (53); Duval (42) potè dimostrare le ciglia in b. dissenterici privi di mobilità, e Celli (43) descrisse come mobile il germe da lui isolato. Questa mobilità andò perduta, insieme ad altri caratteri biologici, nelle successive colture e solo in questi ultimi tempi, forse per speciali condizioni colturali, il b. di Celli si dimostra dotato di una certa mobilità quando si prenda il materiale da giovani agarcolture. Conserva invece le altre proprietà biologiche quali vennero trovate dal De Blasi, solo che da poco tempo in qua può, nelle brodo-colture peptonizzate, produrre indolo.

Astrazione adunque fatta della mobilità, che per alcune varietà di b. dissenterici non sembra carattere ben stabilito, mi sembra possibile ascrivere il germe da me isolato, tenuto conto sovratutto del risultato siero-diagnostico e dell'azione patogena, al *b. dys.* del Celli. Studiati comparativamente le due varietà Manilla e Celli e lo stipite da me isolato, questo nei caratteri principali si comporta come la varietà Celli, ed anche nei terreni colorati, solo che decolora il Rothberger, come la varietà Manilla e decolora con produzione di fluorescenza l'agar con vesuvina.

Ricerche sull'azione patogena dei germi isolati.

Azione patogena dell'enterococco. — Fu esperimentato rispetto al coniglio ed alla cavia con stipiti diversi, scelti anche fra quelli isolati da casi gravissimi e mortali. Le inoculazioni fatte per via sottocutanea e endoperitoneale nella dose di una o due patine di agarcoltura di 24 ore emulsionate in brodo, non dimostrarono alcun potere patogeno nè locale, nè generale. Non ebbi pure risultato introducendo delle brodo-colture *per os* nella cavia.

Azione patogena dell'enterococco associato al b. coli. — Volli ripetere le ricerche del Nobécourt (44), il quale aveva dimostrato che, se non costantemente, molte volte l'associazione dell'enterococco col *b. coli* riesce molto attiva per la cavia. Inoculai pertanto per via sottocutanea varie cavie del peso di circa 250 g. con una patina d'enterococco e con una patina di *b. coli*, possibilmente isolati dallo

stesso caso, scegliendo quei *b. coli* che, o per loro natura oppure per successivi passaggi nei terreni di coltura si dimostravano sprovvisti di virulenza. Mentre le cavie di controllo inoculate rispettivamente con gli stessi stipiti di enterococco e di *b. coli* rimasero in vita, quelle inoculate contemporaneamente coi due germi morirono tutte presentando il reperto anatomo-patologico d'una setticemia di *b. coli.* La morte avvenne nelle 24 ore, e dai visceri e dal cuore si isolò sempre in coltura pura il *b. coli.* Identiche esperienze ripetute sul coniglio fallirono. Volli anche vedere se l'enterococco potesse esaltare la virulenza del *b. coli* atipico *A* dotato di sola azione locale, tanto più che questi due germi avevo isolato contemporaneamente dalle feci in un gravissimo caso di enterite dissenteriforme. I risultati furono positivi per la cavia che muore nelle 24 ore con forte edema gelatinoso sottocutaneo e i soliti fatti congestivi; dal sangue si isola il *b. coli* atipico. I risultati furono invece meno costanti rispetto al coniglio; sopra 4 inoculati solo due morirono, uno nelle 12 ore, l'altro in 4ª giornata, ma anche in questi due animali fu possibile isolare dal cuore il *b. coli* atipico.

Non si può quindi negare che l'enterococco è capace di aumentare la virulenza del *b. coli* o di ridargliela quand'essa vada perduta.

Azione patogena del b. coli. — Non riferisco le ricerche eseguite sulla virulenza dei *b. coli* isolati nella prima serie di ricerche perchè fatte qualche tempo dopo l'isolamento, mi diedero risultati incostanti. Riferisco invece i risultati ottenuti dai *b. coli* della seconda serie di ricerche, di cui saggiai 10 stipiti: per sei di essi la dose minima letale fu di 1/10 di ansa normale, per due di 1/5 di ansa normale, per uno di un'ansa normale e per un altro di tre anse normali rispetto a gr. 250 di cavia. La dose minima letale fu stabilita dopo varie inoculazioni in modo da escludere qualsiasi carattere di accidentalità. La morte avvenne sempre entro le 12 h. e per poche dosi multiple della minima letale, persino in 4-5 h. In genere il quadro anatomo-patologico presentò i caratteri ben noti, che non sto a ripetere; solo che per alcuni stipiti, e in modo costante, il quadro anatomo-patologico si differenziava alquanto da quello comunemente descritto. La cavia muore nelle 12 h. e all'autopsia si riscontra intensa iniezione sottocutanea, con forte arrossamento muscolare. Nel peritoneo scarso liquido fortemente emorragico; congestione dell'intestino e dello stomaco sulla cui superficie si disegna intensamente iniettata l'elegante rete vasale, pure appariscente nel mesenterio, e presentante qua e là chiazze emorragiche, mentre si osserva una profonda anemia del fegato e delle capsule surrenali.

In tutti i casi l'isolamento dai vari visceri e dal cuore (per alcune cavie gravide anche dal liquido amniotico, dalla placenta e dai feti) fu positivo. Non mai però ebbi ad osservare lesioni localizzate all'intestino salvo qualche fatto congestizio, forse in rapporto alla rapidità della morte.

Dato il fatto che parte essenziale delle affezioni colibacillari sono i fenomeni di intossicazione, volli anche ricercare il *potere tossico dei filtrati di brodocolture* di questi *b. coli* virulenti, ripetendo le ricerche già eseguite in questo Istituto rispetto a un virulentissimo stipite dal dott. Levi della Vida (45). Saggiai pertanto i filtrati di brodi peptonizzati, di brodi a base di stomaco e di milza, di brodi glucosati e lattosati, secondo Levi, usando candele Maassen e Silberschmidt. I filtrati di colture di 10, 20, 30 gg. inoculati in cavie di 200-250 gr. in quantità variabile da 0.5 a 10 cc. non diedero risultati apprezzabili; ottenni solo per uno stipite la morte in 24 h. di una cavia inoculata con 6 cc. di filtrato, attraverso Maassen, di brodo zuccherato di 12 gg. col reperto caratteristico descritto dal Levi. Tutte le altre cavie o morirono dopo 10-12 gg. senza reperto positivo o sopravvissero. Solo che per inoculazione di discrete dosi di filtrato l'animale si dimostra abbattuto per 12-24 h., rifiuta di mangiare, rimane immobile, talora col pelo irto, ma poi in breve si rimette e riacquista la sua abituale vivacità. Tali filtrati si dimostrarono inattivi anche verso il coniglio.

Azione patogena del b. dissenterico. — Inoculai quattro cavie per via endoperitoneale del germe che ho creduto identificabile col *b. dys.* Celli, rispettivamente con 6, 3, 2 ed 1 ansa normale di una patina di 24 h. Mentre l'ultima sopravvisse dopo un breve periodo di abbattimento, le altre tre morirono nelle 12 h. presentando il quadro anatomo-patologico riscontrabile nella setticemia da *b. coli*. Ma nonostante la rapidità della morte si riscontrarono nell'intestino specifiche lesioni. Già all'ispezione esterna del cieco e del colon si osservavano come delle isole leggermente elevate, ben circoscritte, colore ardesia, della grandezza variabile da un grano di miglio a quella di un centesimo e più. Queste isole prominenti corrispondono a placche sollevate, tumentose, ben nette ai margini, soffuse di punti emorragici, dalla cui periferia si dipartono i vasi fortemente iniettati che compongono intorno alla placca una elegante rete vascolare, qua e là interrotta da qualche chiazzettina emorragica.

Considerazioni.

Il reperto batteriologico sinora studiato presentò un diverso aspetto per le feci studiate nell'autunno del 1904 e per quelle studiate nell'estate del 1905:

I serie (dal 15 ottobre al 24 novembre 1904). Germi isolati in:

2 casi — *b. vulgare* in coltura pura.

9 casi — *b. coli commune* in coltura pura.

12 casi — *b. coli commune* e *enterococco* (in due casi anche *b. coli atipico*).

1 caso — *b. lactis aërogenes* in coltura pura.

II serie (giugno-agosto 1905). Germi isolati in:

1 caso — *b. vulgare* in coltura pura.

2 casi — *b. coli commune* e *b. vulgare*.

20 casi — *b. coli commune* in coltura pura (in due casi con *b. coli atipico*).

1 caso — *b. coli commune* e *b. dysentericum*.

Non ostante il diverso risultato batteriologico non è però possibile una distinzione clinica, nè rispetto al decorso, nè rispetto alla gravità fra i casi della I serie e quelli della II.

È importante invece notare che mentre nei casi dell'autunno trovai frequente l'associazione del *b. coli*, per sè poco virulento, con l'enterococco, nei casi dell'estate susseguente è il *b. coli*, virulentissimo, che si trova quasi costantemente ed in coltura pura. È adunque al *b. coli*, ed eventualmente alla sua associazione coll'enterococco, che va data la maggiore importanza nella etiologia delle diarree estivo-autunnali dei bambini.

Ciò non toglie che alcune volte i fatti intestinali patologici possono essere in relazione con altri germi; in uno dei nostri casi è p. e. il *b. lactis aërogenes* che prende il sopravvento così da escludere la presenza di qualsiasi altro germe. A proposito di questo batterio, così comune ospite dell' intestino dei bambini, mi piace rilevare il fatto che nelle condizioni patologiche da me osservate esso non fu possibile isolare, se non una volta sola, ed avvertire anche che sarebbe erroneo fare diagnosi di *b. lactis aërogenes* fondandosi solamente sulla mancanza di mobilità e sull'assenza di indolo, quando abbiamo visto che questi due caratteri biologici possono mancare nelle prime colture di isolamento per tipici *b. coli*.

Non si può togliere importanza etiologica neppure al *b. vulgare* che io ho riscontrato nel 10 % dei casi studiati. Già Macé e Mouginet (46) lo avevano segnalato nelle feci dissenteriche e Roger (47) lo ottenne in coltura pura inoculando nelle vene dei conigli emulsioni di muco intestinale. Probabilmente questo germe agisce indirettamente per i prodotti di scomposizione delle sostanze proteiche che esso attacca vivamente.

Più importante considerazione merita l'enterococco, già designato dall'Escherich col nome di *streptococcus enteritidis*, studiato poi sotto questo punto di vista dal Nobécourt e dal Thiercelin e ritenuto causa di enteriti dei lattanti dall'Hirsh (48), dal Libman (49), dallo Spiegelberg (50), tanto più che secondo alcuni AA. sarebbe anche capace di produrre affezioni dell'apparato respiratorio e delle meningi ed anche vere forme di enterococcia generalizzata (Rosenthal, Courtois-Suffit e Trastour) (51).

Nei casi in cui esso fu riscontrato certo che rappresentava buona parte della flora intestinale, talora anche in soprannumero sul *b. coli* col quale costantemente era associato. Esperimentalmente però esso si dimostra sprovvisto di azione patogena, nè sembra agire indirettamente sul contenuto intestinale essendo dotato di scarso o nullo potere fermentativo. Le mie ricerche invece confermano quelle del Nobécourt in quanto realmente la sua associazione col *b. coli* può aumentarne la virulenza.

Agisce in questo modo l'enterococco, oppure non è esso che un germe banale che in determinate condizioni del tubo enterico può pullulare in modo tale da prendere anche il sopravvento, senza che per questo abbia importanza patogena? Le mie ricerche non mi permettono di trarre una conclusione. Ricordo però che il Thiercelin accenna alla possibilità di una tossina enterococcica avendo costantemente osservato negli animali inoculati un marcato dimagramento e fenomeni di cachessia. È un fatto che però io non posso confermare.

In 47 casi isolai il *b. coli* e di questi in 32 in coltura pura, astrazione fatta di quegli scarsi *b. coli* atipici che amo considerare come reperto accidentale.

Non è possibile negare al *b. coli* una parte importante nella etiologia delle diarree estivo-autunnali quando consideriamo che in numerosi casi, esso viene a costituire la esclusiva flora del tubo intestinale e quando, di fronte al *b. coli* abituale saprofita dell'intestino, nei casi di diarrea dissenteriforme può assurgere a virulenze così elevate come quelle da me constatate, per taluni stipiti pari a gr. 0,0008 per 100 gr. di cavia.

Dare importanza etiologica a quell'unico germe isolato che credo identificabile col *b. dysentericum* Celli, non mi è possibile tanto più che si trovava associato a un *b. coli* dotato di discreta virulenza, ma la sua azione esperimentale specifica sul tubo intestinale neppure permette di trascurarlo. Rimane importante il fatto che è possibile riscontrare germi appartenenti al gruppo dei b. dissenterici anche in bambini affetti da diarrea estivo-autunnale e che esiste quindi la possibilità che questi germi, in condizioni di esaltata virulenza, sparsi nell'ambiente, quando le più comuni norme profilattiche, come è di solito, si trascurino, possono dar luogo a sviluppo di epidemie.

Le mie ricerche sembrano indicare una differenza stagionale rispetto ai germi che predominano nel tubo enterico di bambini affetti da diarrea estivo-autunnale, ma stabilire questo fatto spetterà solo ad ulteriori ricerche. Una differenza regionale sembra però che esista realmente; infatti mentre in America quasi tutti gli autori che si occupano dell'argomento, riscontrano b. dissenterici, Volpino a Torino trova un germe a caratteri speciali, ed a Roma le ricerche del Rossi-Doria nel 1892, quelle del Valagussa nel 1899-900 e le mie nel 1904-1905 si concordano tutte ad affermare l'importanza del *b. coli* nella etiologia delle diarree estivo-autunnali dei bambini.

Conclusioni.

I. Nelle feci dei bambini affetti da diarrea estivo-autunnale a tipo dissenteriforme, si isola con maggior frequenza, e bene spesso in coltura pura, il *b. coli.*

II. Il *b. coli* isolato è dotato di forte virulenza, mentre scarso è il potere tossico dei filtrati delle brodocolture.

III. Nelle ricerche eseguite nell'autunno del 1904 fu riscontrata nel 50 % dei casi l'associazione del *b. coli* con l'enterococco, germe per sè sprovvisto di virulenza, ma capace di esaltare il potere patogeno del *b. coli.*

IV. In forme cliniche identiche a quelle prodotte dal *b. coli* si possono però riscontrare anche altri germi e specialmente il *b. vulgare.*

V. Dalle feci di bambini affetti da diarrea estivo-autunnale è possibile isolare anche germi appartenenti al gruppo dei b. dissenterici.

BIBLIOGRAFIA.

1. BAGINSKI. — Arch. f. Kinderheilkunde, XXII.
2. LESAGE. — Revue de méd., 1887-88.
3. BABES. — Wiener med. Presse, 1887.
4. ROGER. — Presse médicale, 1900, n. 1.
5. LESAGE. — l. c. e Arch. de phys., 1888.
6. MARFAN. — Presse médicale, 1900.
7. MACAIGNE et LESAGE. — La Semaine médicale, 1892.
8. ROSSI-DORIA. — Questi Annali, vol. II.
9. VALAGUSSA. — Questi Annali, vol. V.
10. ESCHERICH. — Centralbl. f. Bakt., XXVI.
11. ROGER. — Presse médicale, 1900, n. 53.
12. DE NOBÉCOURT. — *Recherches sur la pathogénie des affections gastro-intestinales des jeunes enfants*. Thèse de Paris, 1892.
13. VOLPINO. — Archivi per le scienze mediche, XXIX.
14. SUKEHITO ITO. — Centralbl. f. Bakt., XXXIV.
15. ESCHERICH nel trattato di KOLLE u. WASSERMANN.
16. FLÜGGE. — Zeitschr. f. Hygiene, XVII.
17. TEDESCHI. — Gazz. degli Osp. e delle Cliniche, vol. XXVI.
18. TISSIER. — Ann. de l'Inst. Pasteur, XIX, n. 5.
19. DUVAL et BASSET. — Centralbl. f. Bakt., XXIII.
20. HISS a. RUSSEL. Medical News, 1903.
21. WOLLSTEIN. — Journal of medic. Research, X, n. 1.
22. FLEXNER a. HOLT. — New-York Roomy et Otten printing C.°, 1904.
23. Proceedings of the New-York pathol. Society, t. III (N. S.).
24. LEINER. — Wiener klin. Wochenschr., XVII.
25. DOPTER, citato nella Rivista critica di medicina, 1905, n. 34.
26. MONTI. — Annali per le scienze mediche, XXIX.
27. MAIONE. — Riforma medica, vol. XXI.
28. GRIMBERT et LEGROS. — Ann. de l'Inst. Pasteur, XIV.
29. THIERCELIN. — Soc. de Biologie, 15 aprile 1899. Id. 24 giugno 1899. Id. 45.
30. ESCHERICH. — Deutsche med. Wochenschr., 1898. Jahrb. f. Kinderheilkunde, XLIX.
31. TISSIER. — Ann. de l'Inst. Pasteur, XIX, n. 2.
32. ERDMANN u. WINTERNITZ. — Münch. med. Wochenschr., 1903.
33. SAMPIETRO. — Bull. della R. Acc. med. di Roma. V. XXXII.
34. PARCK. — Centralbl. f. Bakt., XXXVII.
35. TISSIER. — l. c.
36. CELLI. — Questi Annali, vol. VI.
37. BAJARDI. — *Contributo all'etiologia della dissenteria epidemica in Italia*. Roma, Stamperia Reale, 1903.
38. NEGRI e PANE. — Boll. della Soc. med. chir. di Pavia, 3 novembre 1905.
39. PARK, COLLINS, GOODWIN. — Journ. f. medic. Research., XI.
40. DE BLASI. — Questi Annali, XIV.
41. FLEXNER. — The Univ. of Penna. Medical Bulletin, 1901.
42. DUVAL a. VEDDER. — The Journal of experim. Med., 1902.

43. Celli. — Leyden Festschrift, B. I.
44. De Nobécourt. — l. c. e Semaine médicale, 1899.
45. Levi della Vida. — Questi Annali, XVI.
46. Macé. — Traité de Bact., p. 970.
47. Roger. — Soc. de Biologie, 7 ottobre 1899.
48. Hirsh. — Centralbl. f. Bakt., XXII.
49. Libman. — Centralbl. f. Bakt., XXII.
50. Spiegelberg. — Centralbl. f. Bakt., XXIV.
51. Courtois-Suffit et Trastour. — Gaz. des Hôpitaux, 1904.
52. Bulletin de l'Inst. Pasteur — IV, n. 2.
53. Dunn. The Journ. of med. Research, XI.

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI MESSINA

Nuove osservazioni sul passaggio dei microrganismi a traverso l'intestino di alcuni insetti

per il dott. **GIUSEPPE CAO.**

§ 1. — Su alcuni stipiti patogeni di batteri saprofiti.

Alcuni anni fa (1), studiando il passaggio dei germi patogeni a traverso l'intestino di certi insetti, appartenenti ai gen. *Blaps*, *Pimelia*, *Tentyria* e *Periplaneta* (*P. orientalis*, la comune blatta delle case), isolai dal contenuto intestinale di alcuni di essi, degli stipiti di *B. fluorescens liquefaciens*, di bacillo similcarbonchio, di un bacillo proteisimile e di una sarcina alba, patogeni per i comuni animali di esperimento.

Il b. similcarbonchio si presentava della grandezza e della forma del comune bacillo del carbonchio, in catene di 2-3 membri, mobilissimi in goccia pendente, che perdevano la loro mobilità col soggiorno nel termostato, che fluidificavano la gelatina e il siero di sangue, sporigeni, non resistenti al metodo di Gram, i quali anche nelle piastre davano sviluppo a colonie molto simili a quelle del carbonchio ematico.

Questo similcarbonchio uccideva le cavie e i conigli in 2-3 giorni, con note anatomopatologiche molto simili a quelle che dà il carbonchio ematico, ed era patogeno anche per i colombi.

Il bacillo proteisimile era mobile, fondente la gelatina e il siero, asporigeno, non resistente al metodo di Gram e uccideva le cavie e i conigli in 24-72 ore, con forte edema, tumore di milza, ascite.

La sarcina alba e il *B. fluorescens liquefaciens* non si distinguevano dagli stipiti comuni che per il loro potere patogeno; l'uno uccideva le cavie e i conigli in 2-3 giorni, con intenso edema gelatinoso diffuso a tutta la parete addominale, vasti ascessi alla sede dello in-

nesto, tumore di milza notevole, talora ascite; quella non produceva che ascessi locali e un modico tumore di milza.

I bacilli fluorescenti sono di solito saprofiti, e se in qualche caso divengono patogeni per gli animali di esperimento, acquistano solo una scarsa virulenza. Più costantemente invece conservano i caratteri di saprofitismo i bacilli similcarbonchio e le sarcine.

Tuttavia da vari osservatori furono già descritte parecchie forme di saprofiti che avevano assunto un potere patogeno abbastanza spiccato.

Il Lepierre (2) per il primo isolò dall'acqua di una cisterna di Coimbra un bacillo mobile, cigliato, non fondente, rapidamente fluorescente, non resistente al metodo di Gram, che uccideva le cavie con un reperto anatomo-patologico di peritonite e di ascessi del fegato.

Il Loewenberg (3) isolò dalla mucosa nasale di un ozenatoso una sarcina alba, immobile, resistente al metodo di Gram, non fondente, che iniettata nella cavità peritoneale delle cavie, dei conigli, dei topi, li uccideva in 24 ore, con una forma di peritonite sierofibrinosa.

Lo Schläfrig (4) da un secreto ozenatoso isolò un germe affine al micrococco tetragono, che si raggruppava a pacchetti nelle colture e che era dotato di spiccato potere patogeno.

Bänziger e Silberschmidt (5) descrissero un bacillo sottile, che isolarono da un caso di panoftalmia da lesione traumatica, il quale anche nei conigli riproduceva una panoftalmia purulenta; e isolarono lo stesso germe anche dal terreno della località ov'era avvenuta l'infezione.

Il Polatti (6), con ricerche sistematiche su molti stipiti di bacillo sottile, osservò che l'introduzione di corpi estranei infetti nella camera anteriore dei conigli, riproduceva costantemente una tipica panoftalmite.

Il Lorrain (7) isolò in un caso di pleurite putrida il *B. ramosus* di Veillon e Zecker, col quale potè riprodurre negli animali una pleurite putrida.

Il Brünig (8), in un caso di ittero infettivo di un bambino, isolò dal fegato, dalla bile, dai reni, dalla milza e dal sangue, un *B. proteus fluorescens* dotato di un elevato potere patogeno per le cavie, per i topi e per le rane.

Di bacilli simili a quelli del carbonchio, dotati di potere patogeno, senza tener conto del *B. anthracoïdes* di Hueppe e Cartwright Wood (9), che produceva solo fenomeni di reazione locale, ma immunizzava gli animali contro le iniezioni del vero bacillo carbonchioso, troviamo descritte nella letteratura parecchie forme.

Una ne descrisse lo Schulz (10) che la isolò dal sangue di una capra; un'altra ne descrisse il Borri (11), più vicina forse al bacillo sottile che al *B. anthracis*; una terza ne isolò il Klein (12) dal sangue di una vacca ritenuta affetta da carbonchio.

Il Giannone (13) isolò pure un bacillo similcarbonchio immobile, sporigeno, che uccideva in 4 giorni le cavie e i conigli, senza edema e tumore di milza. L'A. ritenne trattarsi piuttosto che di un bacillo del carbonchio attenuato, di uno stipite modificato nelle sue condizioni di virulenza.

L'Ottolenghi (14) studiò accuratamente tre stipiti di bacilli similcarbonchio, patogeni per la cavia, dei quali uno (*A*) era immobile, e spiegava un potere patogeno molto simile a quello del bacillo del carbonchio, mentre

gli altri due (*B* e *C*) erano mobili e avevano un'azione patogena debole e profondamente differente da quella del *B. anthracis*. Secondo l'A. il bacillo *A* sarebbe un vero bacillo del carbonchio attenuato, gli altri due apparterrebbero a un gruppo intermedio fra il bacillo del carbonchio e il *B. subtilis*.

Il Sacquepée (15), in un caso di tifo anomalo, isolò dal sangue dell'ammalato uno stipite di *B. mesentericus*, d'origine intestinale, che aveva i caratteri dello stipite reso patogeno dal Vincent col passaggio ripetuto a traverso le cavie.

Il Lombardo (16) isolò un bacillo similcarbonchio patogeno, che uccideva le cavie con una forma di setticemia, con edema sieroematico e tumore di milza.

Un'altra forma di bacillo similcarbonchio di cui le colonie erano simili a quelle del b. del carbonchio e che provocava negli animali una setticemia, col quadro anatomopatologico degli animali morti per carbonchio, isolò lo stesso Lombardo (17) dal sangue di una cavia morta per infezione spontanea.

Il Guargena (18), dal contenuto intestinale dei lombrici, isolò due bacilli similcarbonchio, uno pochissimo mobile, che uccideva le cavie senza lesioni spiccate, tranne un notevole tumore di milza; l'altro dotato di movimenti molto vivaci, che provocava un edema gelatinoso sottocutaneo e cospicuo tumore di milza. Le due forme non erano patogene per i conigli.

Nel corso di queste ricerche, come dirò più innanzi, io stesso isolai un altro stipite di bacillo similcarbonchio fortemente patogeno, molto simile a quello isolato pure dalle blatte e descritto nel lavoro precedente. E altri stipiti di bacilli similcarbonchio patogeni isolai pure dal contenuto intestinale delle larve di maggiolino (*Melolonta vulgaris*), dalle deiezioni di alcune mosche (*Sarchophaga carnaria*) e da alcuni campioni di uova di pollo, e li descriverò in altro lavoro.

In questo stesso istituto due anni fa, il dottor De Angelis isolò dai muscoli di una cavia, morta da qualche giorno e lasciata putrefare, un *B. fluorescens liquefaciens* intensamente patogeno, e il Lombardo isolò la stessa forma dall'aria della stanza ove si trovava la cavia (comunicazione orale).

§ 2 — Variazioni di virulenza dei germi patogeni.

Come si vede, non sono infrequenti le osservazioni di forme batteriche, ritenute per lo innanzi esclusivamente saprofitiche, che talora assumono uno spiccato potere patogeno. Nè il fatto desta più meraviglia, dopo gli studi batteriologici dell'ultimo decennio, che hanno messo in evidenza singolari affinità morfologiche e biologiche fra molti batteri patogeni (B. del tifo, della difterite, della tubercolosi, ecc.), e molti stipiti saprofitici a loro somiglianti: bacilli tifosimili, colisimili, bacilli colerasimili, bacilli pseudodifterici, pseudotubercolari, pseudocarbonchiosi, pseudotetanici, pseudopestosi, ecc.

In questa rapida rassegna abbiamo accennato a più stipiti di bacilli similcarbonchio, più o meno vicini al bacillo vero del carbonchio.

Per quanto riguarda i bacilli fluorescenti, ricorderò le interessanti osservazioni del Ruzicka (19) il quale, dopo avere stabilito la affinità fra il bacillo piocianeo e il *B. fluorescens liquefaciens*, in uno studio comparativo fra le due specie, riuscì, mantenendo per 18 giorni, un bacillo fluorescente, nella ferita di una cavia, a renderlo più adatto a crescere in termostato, in un caso, in un altro a fargli acquistare i caratteri culturali del bacillo piocianeo. che poi si mantennero inalterati per sei mesi. Egli osservò pure come, d'altro canto, il bacillo piocianeo, in condizioni saprofitiche, specie nell'acqua, si trasformi poco a poco nei suoi caratteri, sino ad avvicinarsi di molto, dopo settimane o mesi, al *B. fluorescens liquefaciens*.

Così il *B. fluorescens liquefaciens* potrebbe considerarsi non altro che un bacillo *similpiocianeo*.

Il Gessard (20) da suo canto, ebbe ad osservare un bacillo piocianeo che, in certe condizioni, elaborava un pigmento fluorescente, simile affatto a quello del *B. fluorescens liquefaciens*.

Ho voluto riportare con cura tutta la bibliografia su l'argomento, perchè le osservazioni su citate valgono a lumeggiare molti fatti esposti più innanzi in questo lavoro.

Ormai i batteriologi non ritengono in modo alcuno costanti i caratteri biologici e patogenetici dei singoli microrganismi.

Già il Pasteur aveva notato come delle vecchie culture di bacillo del colera dei polli, che avevano perduto il loro potere patogeno, non lo riacquistassero neanche col passaggio successivo nei polli stessi; e aveva osservato come il bacillo del mal rosso dei suini perdesse completamente la virulenza col passaggio a traverso l'organismo del coniglio. Lo stesso fatto avrebbe osservato il Kotzmann per il bacillo del colera dei polli.

Toussain, Chamberland, Roux dimostrarono come si possano avere degli stipiti di bacilli del carbonchio affatto sprovvisti di virulenza.

Osservazioni simili furono fatte su lo streptococco, sul bacillo del mal rosso, sul vibrione del colera, sul bacillo del tifo, ecc., e noi vediamo tuttodì attenuarsi, sino a perdere completamente la virulenza, la maggior parte dei batteri delle nostre collezioni di laboratorio.

Accennai più su al *B. anthracoïdes* di Hueppe e Wood (9) che ha azione immunizzante contro il bacillo del carbonchio, non solo, ma che permette di isolare, dagli animali preparati, e poi inoculati colle culture di b. del carbonchio, quest'ultimo, non più mortale per i topi.

Una tale immunizzazione verso il carbonchio, negli animali trattati per 15 giorni con dosi crescenti di brodoculture di bacilli similcarbonchio ottenne anche l'Ottolenghi (14).

Il Manfredi (21) ottenne delle culture di bacilli del carbonchio avirulenti conservandoli in terreni di nutrizione grassi.

Il Binaghi (22) constatò un'avirulenza completa nei bacilli del carbonchio che avevano soggiornato per alcuni giorni nel pus, sia *in vitro* che nella cavità di ascessi provocati sperimentalmente, nei cani o nei conigli, con iniezioni di amido.

Le molteplici osservazioni di bacilli similpatogeni o pseudopatogeni, sono un indice della variabilità del carattere della patogenicità dei batteri, sia che essi vogliansi considerare come forme patogene attenuate, o come forme originariamente saprofitiche che, adattandosi a mutate condizioni di ambiente, abbiano acquistato un potere patogeno più o meno costante. Così si può ammettere che quando un germe, dapprima innocuo, si trova in condizioni che gli permettono di svilupparsi, in un animale recettivo, se il caso gli offre condizioni favorevoli e l'opportunità di realizzare un certo numero di passaggi, il saprofita diverrà patogeno e si potrà avere una nuova forma di malattia infettiva. Questo concetto fu sostenuto ripetutamente dallo Hueppe (23).

Alcuni autori avrebbero osservato reazione alla tubercolina in animali infettati con bacilli pseudotubercolari, ciò che farebbe sospettare una identità di origine o per lo meno una grande affinità fra queste forme e i bacilli di Koch.

L'antagonismo di alcune forme batteriche fra di loro e la simbiosi di altre specie possono pure aiutare a spiegare queste variazioni di virulenza.

Il Roger (24) osservò come il bacillo prodigioso esalti la virulenza del bacillo dell'edema maligno, dello streptococco, del b. del carbonchio (nelle cavie, mentre la attenua nel coniglio).

Osservazioni simili fecero Vaillard e Vincent (25) sul bacillo del tetano, il Monti (26) e il Besson (27) sul bacillo dell'edema maligno. Il Marx (28) invece virulentò il *B. prodigiosus* iniettandolo nelle rane assieme col bacillo dell'edema maligno.

Il Pawlowsky affermò che i conigli ai quali s'inocula il b. prodigioso riescono a superare l'infezione carbonchiosa e il Bertarelli (29) trovò che per lo meno la morte è ritardata.

Altre osservazioni del Pawlowsky, del Watson Cheyne, del Dungern, del Bertarelli dimostrerebbero un antagonismo fra il bacillo del carbonchio e il pneumobacillo di Friedländer.

Il Galtier (30) aveva già illustrata nel 1894 l'esaltazione di virulenza di alcuni germi, dovuta alle associazioni batteriche.

Il Beco (31) partendo da un'esperienza del Baumgarten, il quale, avendo inoculata una cavia con pochi stafilococchi, ma molti bacilli del carbonchio, la vide morire di setticemia da stafilococco, mentre il bacillo del carbonchio si esauriva, trovò che coltivando insieme lo stafilococco e il bacillo del carbonchio, quello aumenta di virulenza mentre questo si attenua progressivamente. Simili risultati ebbe il Pawlowsky (31) nei conigli.

L'Hilbert (33) notò come il bacillo difterico esalti la sua virulenza in simbiosi con lo streptococco.

§ 3. — Batteri saprofiti resi artificialmente patogeni.

Nel lavoro precedente a questo, riferiva, come, dubitando che le forme batteriche patogene riscontrate nell'intestino delle blatte fossero dei comuni saprofiti che avessero acquistato un grado variabile di virulenza, nel passaggio a traverso l'intestino dei coleotteri, piuttosto che delle varietà patogene, avessi alimentate delle blatte con colture di altri saprofiti, che poi, isolati dalle feci, apparivano dotati di potere patogeno ben manifesto. E che si trattasse di vere infezioni prodotte con le inoculazioni e non di banali intossicazioni da proteine, è provato dalle inoculazioni di controllo praticate con quantità notevoli di colture degli stessi saprofiti, prima del passaggio nelle blatte, e riuscite sempre innocue.

Così acquistavano potere patogeno uno stipite di *B. fluorescens non liquefaciens*, un altro di *B. fluorescens liquefaciens*, uno di *B. subtilis* e una sarcina.

Poco dopo il Vincent (34) coltivando il *B. megatherium* e il *B. mesentericus vulgatus* in sacchetti di collodio, introdotti nel cavo peritoneale degli animali di esperimento, con la tecnica già suggerita dal Metchnikoff, notò che questi germi, dopo alcuni passaggi, acquistavano un notevole potere patogeno, tanto da provocare la morte delle cavie, dei conigli, dei sorci bianchi. L'A. ne traeva la conclusione che il potere patogeno è un carattere di assai debole costanza nei microrganismi, e che molti batteri, malgrado la comune tendenza a conservare i caratteri ereditari, possono, adattandosi a nuove condizioni di vita, acquistare la proprietà di produrre sostanze diastasiche tossiche, mercè le quali attaccano la cellula vivente per svilupparsi poi a sue spese.

Questi fatti illuminano la questione ancora così discussa e oscura della spontaneità morbosa, permettendo di spiegare il riprodursi di epidemie, da lungo tempo scomparse, e di cui l'agente patogeno può trovare in certi organismi inferiori un terreno propizio all'esaltamento della propria virulenza.

Dopo le mie osservazioni e quelle del Vincent, altri sperimentatori riuscirono, con vari artifizi, a conferire ad alcuni saprofiti un certo potere patogeno.

Il Martoglio (35) riuscì a rendere patogeni un bacillo tifosimile, un colisimile e un bacillo simildifterico non patogeni, coltivandoli in agar con filtrati di brodoculture di b. di Eberth, di *B. coli* e di bacillo difterico, in condizioni di anaerobiosi, e fin qui si potrebbe pensare a un semplice riesaltamento di virulenza di batteri patogeni attenuati. Ma egli riuscì a rendere patogena anche una sarcina gialla, coltivandola in agar contenente i prodotti solubili di microrganismi patogeni, e osservò che contemporaneamente se ne modificavano i caratteri morfologici e culturali sino a renderla simile a quella di Löwenberg (3).

Il Casagrandi (36) rese patogeno uno stipite non patogeno di bacillo tifosimile, coltivandolo nel vuoto, su terreni di nutrizione contenenti prodotti solubili del bacillo del tifo, dopo pochi passaggi, e rese virulento pure un *B. Zopfii*, coltivandolo in substrati contenenti i prodotti solubili di un similtifo patogeno.

L'Hamburger (37), ammettendo che l'esaltazione della virulenza dei batteri patogeni col passaggio attraverso gli animali recettivi, avviene per il fatto che i batteri inoculati, nella lotta contro l'organismo dell'animale di esperimento danno luogo a formazioni di gruppi aptofori, cercò di esaltare *in vitro* la virulenza dei batteri, coltivandoli in presenza degli anticorpi e ottenne p. e. un aumento di virulenza molto notevole (sino al quadruplo dell'iniziale) dei bacilli del colera coltivandoli in un siero immunizzante molto allungato. Non sarebbe questo che un caso specifico della legge generale, per la quale si avrebbe un'esaltazione della virulenza con la coltivazione dei batteri in un mezzo sfavorevole, ammessa anche dallo Shaw (38), che osservò come la virulenza dei bacilli del tifo e del carbonchio divenisse doppia e persino quadrupla, con i passaggi ripetuti nel siero di sangue, per una specie di selezione artificiale dei bacilli che resistono meglio all'azione battericida del siero.

Il Baiardi (39) riuscì a rendere patogeni il *M. candicans* e il *M. aurantiacus* coltivandoli anaerobicamente coi prodotti solubili dello stafilococco piogene aureo.

Molti anni prima, del resto, già il Sanfelice (40) aveva notato come il pseudobacillo dell'edema maligno e il pseudobacillo del carbonchio sintomatico divenissero patogeni quando erano coltivati in substrato di nutrizione contenente i prodotti solubili degli anaerobi patogeni. E inoculando sotto la pelle delle cavie il pseudobacillo dell'edema maligno non patogeno, insieme con pezzi di milza, di fegato, di rene raccolto asetticamente da cavie sane, otteneva in 24 ore la morte degli animali per edema maligno, mentre il germe riisolato conservava poi la virulenza così acquistata. Egli riteneva che negli organi avvenissero dei processi di riduzione per i quali si formavano delle sostanze capaci di ridare la virulenza ai bacilli dell'edema maligno.

Il Monti (26) per primo aveva osservato come i prodotti di alcuni batteri possano ridare la virulenza ai germi patogeni che l'hanno perduta; e così riprende la virulenza perduta o attenuata il pseudobacillo inoculato insieme con i prodotti solubili del *proteus vulgaris* o di altri saprogeni.

Un fenomeno analogo si verifica per quanto riguarda la tossicità di alcune forme batteriche e il Sanfelice (39) dimostrò come il pseudobacillo del tetano, coltivato in substrato contenente tetanotossina, vi acquisti potere tossico.

Nel campo della patologia vegetale il Laurent (41) dimostrò che due specie batteriche saprofitiche, il *B. coli* e il *B. fluorescens putidus*, potevano essere trasformate artificialmente in ispecie parassitarie per le piante.

Il Lepoutre (42) poi, riuscì a rendere patogeni per le piante, coltivandoli su patate o su carote, a 30°, un *B. fluorescens liquefaciens*, un *B. mycoides* e un *B. mesentericus vulgatus*, prima completamente innocui.

In questi ultimi anni intanto un lavoro molto analogo a quello pubblicato da me, fu eseguito dal Küster (43), il quale, studiando il passaggio

dei germi patogeni a traverso l'intestino delle blatte, osservò come i bacilli del carbonchio subissero un esaltamento della loro virulenza; ma non si curò di ricercare a quali fattori fosse dovuto quest'esaltamento; accennò d'altro canto a una diminuzione di virulenza dei bacilli del colera dei polli e della peste, ma senza stabilire dei confronti precisi, perchè non potè isolare i bacilli stessi dalle feci, che dopo un periodo brevissimo dall'ingestione.

Se quindi il lavoro del Küster riesce di piena conferma a quella parte delle mie ricerche che concerneva il passaggio dei germi a traverso l'intestino delle blatte, e con le osservazioni sul modo di comportarsi del bacillo del carbonchio corroborava anche indirettamente i miei risultati su l'esaltazione di virulenza di certi germi nell'intestino degli insetti, non portava d'altro canto alcun lume che valesse a illustrare questo fenomeno, pur tanto importante (*).

§ 4. — Esame batteriologico del contenuto intestinale delle blatte.

Da quanto sono venuto esponendo appare che molti sono i germi saprofiti che possono in date condizioni acquistare potere patogeno, e varie sono le condizioni nelle quali appare la virulenza.

Nel lavoro già citato, dopo avere stabilitto il fatto dell'acquisto di virulenza per parte di alcuni saprofiti, nel passaggio a traverso l'intestino delle blatte, mi domandava a quali cause dovesse attribuirsi il fenomeno in questione; ma non mi venne fatto allora di rispondere al quesito che con induzioni.

Il fenomeno, d'altra parte, appariva di tale importanza, specie in seguito ai lavori posteriori al mio, che meritava di essere studiato *ex professo*.

Nel riprendere tale studio, anche a Messina, come già a Cagliari, mi procurai parecchie serie di blatte di diversa provenienza. Senza prelevare il contenuto intestinale di ogni blatta, tenuta in scatola di vetro sterile, come fece il Küster (43) (**), il che non avrebbe eliminato affatto la

---

(*) L'intestino delle blatte forniva anche materiale di studio ad una interessantissima serie di ricerche compiute dallo Schaudinn (44), il quale osservò che in esso avviene la sporificazione del *B. Butchlii*, che non si verifica nell'intestino di questo insetto *in vitro*.

(**) L'esame individuale del contenuto intestinale di ogni blatta si rendeva d'altra parte superfluo anche per la considerazione che questi insetti per lo più vivono a frotte e per la ricerca dell'alimento invadono gli stessi luoghi contemporaneamente, formando talora delle vere colonie, in un armadio, in una cassa, ecc., ove talora vivono e si riproducono per molti anni di seguito. Si stabilisce quindi una costante uniformità del loro contenuto intestinale, per la quale le piastre delle feci di ogni insetto, come ebbi già a constatare qualche anno fa, per la ricerca delle varie specie, si corrispondono perfettamente.

possibilità dell'inquinamento del materiale coi germi dell'aria, mentre non mi avrebbe fornito materiale sufficiente per le inoculazioni negli animali, riponeva ogni serie di insetti in grandi scatole di vetro e dopo 1-2 giorni, quando non erano rimaste in vita che le blatte che avevano resistito ai traumi inerenti alla cattura e al trasporto al laboratorio, le prendevo una per una con le pinze e, se occorreva, comprimendo loro l'addome con altre pinze, raccoglievo con una spatola di platino la gocciolina di feci che appariva all'orifizio anale.

Stemperavo poi le feci in acqua sterile, e utilizzavo l'emulsione per le inoculazioni negli animali e per l'allestimento delle piastre d'isolamento. Una porzione, riscaldata a 65° per 20 minuti, era utilizzata per la ricerca dei germi sporigeni, mediante altre piastre e altre inoculazioni.

Alcune anse di quest'emulsione, agitate in agar ad alto strato, che facevo solidificare rapidamente, mi servivano per la ricerca degli anaerobi.

Dopo sviluppate le piastre, quella di esse che era riuscita più piena di colonie, serviva per le inoculazioni di controllo *in toto*, stemperando le colonie in acqua sterile.

Ciò per evitare che sfuggisse alla ricerca qualche germe patogeno che eventualmente avesse potuto trovarsi nelle feci in quantità troppo esigua per potere esplicare il suo potere patogeno.

Dopo 15 giorni dacchè le blatte erano nel laboratorio, a digiuno, riprendevo gli insetti uno per uno, trasportandoli in altra scatola pulita, e raccoglievo di nuovo le feci, per fare nuove inoculazioni e nuove piastre.

In queste seconde piastre spesso apparivano delle forme non riscontrate nel primo esame, e assunte dalle blatte nel soggiorno in laboratorio, cosa che del resto avevo già notato nelle ricerche precedenti; ma si trattava sempre di germi banali provenienti dall'aria.

Prima serie di blatte. 29 novembre 1904.

Provenienza. Armadio di casa signorile.

Piastre. Molto piene, contengono molte forme schizomicetiche, un blastomicete a cellule rotonde e patina colturale bianca, il *Sacch. niger*, un oidio non patogeno, alcune colonie di muffe.

Inoculazioni. Una cavia inoculata con l'emulsione delle feci muore dopo 29 ore con cospicuo edema al sito d'inoculazione e senza tumore di milza. Dalle piastre d'isolamento della milza e del sangue del cuore si isolano:

1° il *B. coli*.

2° un bacillo tifosimile a patina tenuissima iridescente (stipite *A*);

3° un altro tifosimile a patina più spessa bianca opaca (stipite *B*).

Questi tre germi si coltivano in brodo e di ciascuno di essi si inocula ad una cavia un cmc. di brodocultura di 34 ore.

La cavia inoculata col *B. coli* muore dopo 24 ore, con reperto di edema sottocutaneo e tumore di milza, dal sangue del cuore si riisola il *B. coli*

La cavia inoculata col similtifo a patina tenue, muore dopo 29 ore, con intensa iperemia del connettivo sottocutaneo del sito di inoculazione, senza tumore di milza; si riisola il similtifo dal sangue del cuore.

La cavia inoculata con l'altro similtifo, muore dopo 5 giorni, con un voluminoso ascesso della porzione declive della parete addominale. Dal pus si riisola il similtifo inoculato.

Un coniglio inoculato con le feci muore dopo 48 ore, con scarso edema

sottocutaneo. Dall'edema e dal sangue del cuore si isolano il *B. coli* e il similtifo a patina tenue, che isolati e coltivati in brodo si mostrano egualmente patogeni.

L'inoculazione delle piastre *in toto* dà gli stessi risultati.

L'inoculazione delle feci sottoposte al riscaldamento per l'isolamento dei germi sporigeni non dà alcun risultato.

Le culture anaerobiche dànno sviluppo a un pseudobacillo del tetano che non appare patogeno.

Dalle piastre delle feci si isolano fra molte altre specie banali i germi seguenti:

a) *B. fluorescens liquefaciens* (stipite *A*);
b) B. similcarbonchio (stipite *A*);
c) B. proteisimile (stipite *A*);
d) *B. mucosus capsulatus;*
e) *B. radiciformis;*
f) *B. megatherium.*

Di essi si inoculano le brodoculture di 24 ore per saggiarne la virulenza e si serbano le culture per le esperienze ulteriori.

L'inoculazione delle feci delle blatte di questa stessa serie, dopo 15 giorni di digiuno dà i seguenti risultati:

Una cavia muore dopo 5 giorni con un ascesso al sito d'inoculazione; dal pus si isola il *B. coli* e il tifosimile a patina tenue. Il *B. coli* saggiato in coltura pura appare egualmente virulento, il tifosimile appare lievemente attenuato.

Un coniglio, inoculato con la stessa emulsione di feci, muore dopo 7 giorni con un ascesso da *B. coli*. Lo stesso germe isolato e coltivato in brodo uccide in 4 giorni un altro coniglio con lo stesso reperto.

Seconda serie di blatte. 11 dicembre 1904.

Provenienza. Cassa di stracci in casa di povera gente.

Piastre. Meno piene. Molte forme schizomicetiche, il fermento roseo, un oidio a patina bruniccia, varie muffe.

Inoculazione delle feci provoca la morte di una cavia dopo 24 ore con lieve infiltrazione sottocutanea, senza edema. Dalla milza e dal sangue del cuore si isolano:

1° il *B. coli;*
2° un bacillo tifosimile (stipite *C*);
3° un bacillo proteisimile (stipite *B*).

Le brodoculture di 24 ore di questi germi, sono inoculate a tre cavie (1 cmc.).

La cavia inoculata col *B. coli* muore dopo 36 ore senza note anatomopatologiche spiccate; dal sangue del cuore si riisola il *B. coli.*

La cavia inoculata col b. tifosimile, muore dopo 78 ore, con un focolaio purulento limitato al sito d'inoculazione, e presenza del germe nel sangue.

La cavia inoculata col b. proteisimile sopravvive; il germe evidentemente non esercita un potere patogeno a sè, ma si moltiplicava nell'organismo insieme con gli altri due germi patogeni.

Nel coniglio l'inoculazione delle feci provoca la morte dopo 3 giorni, con lieve infiltrazione sottocutanea. Dalla milza e dal sangue del cuore si isolano il *B. coli* e un b. tifosimile. L'inoculazione della brodocultura del *B. coli*

in un altro coniglio provoca la morte dopo 4 giorni, con suppurazione locale da *B. coli;* l'inoculazione del tifosimile è seguita dalla morte dell'animale dopo 7 giorni, senza lesioni anatomo-patologiche.

Dalle piastre delle feci si isolano i seguenti germi:

a) *B. fluorescens fluidificans* (stipite *B*);

b) *B. fluorescens non liquefaciens* (stipite *A*);

c) *Sarcina lutea* (stipite *A*);

d) *B. radiciformis;*

e) un b. proteisimile (stipite *B*); tutti questi germi sono sprovvisti di virulenza.

L'inoculazione delle feci riscaldate non permette di isolare alcun germe sporigeno patogeno.

Le colture anaerobiche non dànno alcun risultato.

Le feci di questa serie di blatte, inoculate di nuovo dopo 18 giorni di digiuno, dànno un reperto poco dissimile; si riscontrano gli stessi germi lievemente attenuati.

Terza serie di blatte. 4 gennaio 1905.

Provenienza. Casa d'abitazione di famiglia povera.

Piastre. Molto povere, varie forme schizomicetiche, un oidio (non patogeno), il *Saccharomyces albus* e il *S. niger*, parecchie muffe.

Inoculazione delle feci. La cavia inoculata muore dopo 36 ore, con edema sottocutaneo e lieve tumore di milza. Dalla milza e dal sangue del cuore si isolano:

a) il b. del pseudoedema maligno;

b) il *B. coli*; i quali si coltivano in brodo e si inoculano dopo 24 ore ad altre due cavie. La prima muore dopo 36 ore con un reperto tipico di pseudoedema, l'altra muore dopo 48 ore con lieve edema sottocutaneo, senza tumore di milza.

Il coniglio, pure inoculato con le feci, muore dopo 48 ore, con intenso edema sottocutaneo, con moderato grado di enfisema e scarso tumore di milza; dal cuore e dalla milza si isolano:

a) il b. aerobio del pseudoedema maligno;

b) il *B. coli*;

c) un bacillo proteisimile (stipite *C*).

Le brodoculture di questi tre germi inoculate ad altri tre conigli li uccidono: il primo dopo 29 ore, con reperto di edema sottocutaneo, intenso tumore di milza, presenza del bacillo inoculato nel sangue del cuore; il 2° dopo 60 ore, con scarso edema, punto tumore di milza, presenza del *B. coli* coltivabile dal cuore; il 3° con un ascesso della parete addominale, dal pus del quale si riisola il bacillo proteisimile.

Dalle piastre delle feci si isolano fra altri germi banali:

a) una sarcina alba (stipite *A*);

b) una sarcina gialla (stipite *B*);

c) il *B. megatherium*;

d) uno streptococco;

e) uno stafilocco aureo.

I primi tre sono completamente innocui, lo streptococco e lo stafilococco hanno potere piogenico, ma non uccidono gli animali inoculati.

La ricerca di germi patogeni sporigeni e quella degli anaerobi non dà risultato positivo.

L'inoculazione delle feci delle stesse blatte, ripetuta dopo 20 giorni di digiuno, uccide una cavia e un coniglio dopo 4 giorni, con un ascesso al sito d'inoculazione. Dalla milza della cavia e dal pus del coniglio si isola solo il *B. coli*, che appare meno virulento.

Quarta serie di blatte. 1 marzo 1905.

Provenienza. Sottoscala, in prossimità di una cassa per le spazzature.

Piastre. Pienissime. Molti schizomiceti, l'*O. albicans* e l'*O. lactis*, molte muffe.

Inoculazione delle feci. La cavia muore dopo 42 ore, con edema sierosanguinolento sottocutaneo, cospicuo tumore di milza. Dalle piastre della milza si isolano:

a) il *B. coli*;

b) un bacillo tifosimile (stipite *D*);

c) un bacillo similcarbonchio;

d) il *B. fluorescens non liquefaciens*.

Dal sangue del cuore si isolano il *B. coli* e il bacillo similcarbonchio.

Questi quattro germi sono inoculati, in ragione di un cmc. di brodocultura di 24 ore, a quattro cavie.

La cavia inoculata con la brodocoltura di *B. coli* muore dopo 4 giorni e non presenta all'autopsia che un ascesso al sito d'inoculazione; dal pus del sangue si riisola il *B. coli*.

La cavia inoculata col bacillo tifosimile muore dopo circa 50 ore, con lieve edema sottocutaneo e presenza del tifosimile coltivabile nel sangue.

La cavia inoculata col b. similcarbonchio muore dopo 40 ore, con intenso edema sierosanguinolento sottocutaneo, enorme tumore di milza, presenza del b. similcarbonchio nel sangue dei cuore.

La cavia infine che era stata inoculata col *B. fluorescens non liquefaciens* muore dopo 48 ore, senza note anatomopatologiche degne di rilievo, ma con presenza del *B. fluorescens non liquefaciens* nel sangue.

Il coniglio, pure inoculato con le feci, muore dopo 54 ore, con un reperto simile a quello della cavia. ma con minore tumor di milza. Dalla milza e dal sangue del cuore si isolano:

a) il *B. coli*;

b) il bacillo similcarbonchio;

c) il bacillo fluorescente non fondente.

Le brodoculture di questi germi sono inoculate ad altri tre conigli, nella solita dose. Il coniglio inoculato col bacillo similcarbonchio muore dopo 48 ore, con un reperto necroscopico simile a quello che dà il carbonchio ematico, gli altri due conigli muoiono dopo 8 giorni con una semplice raccolta purulenta al sito d'inoculazione.

L'inoculazione delle feci riscaldate per 20′ a 65° uccide gli animali con lo stesso reperto e dal coniglio inoculato col b. similcarbonchio e dal sangue si isola in coltura pura il bacillo similcarbonchio.

Colture anaerobiche negative.

Dalle piastre delle feci si isolano alcune sarcine, *alba*, *lutea*, *aurantiaca* una *Streptothrix alba*, il b. similcarbonchio (stipite *B*.) e il *B. fluorescens non liquefaciens* (stipite *B*), il *B. coli*, un b. tifosimile (stipite *D*). L'inoculazione di questi germi isòlati in coltura pura, conferma i risultati della inoculazione delle feci.

Dopo 21 giorni si ripete l'inoculazione delle feci. Il *B. coli* e il tifosimile sono ancora piogeni, ma non uccidono gli animali; il bacillo similcarbonchio conserva ancora la sua virulenza: uccide gli animali con lo stesso reperto, ma con tumore di milza meno intenso e dopo 3 giorni dallo innesto.

Nella seguente tabella appare riassunto il reperto di batteri patogeni isolati dal contenuto intestinale delle blatte:

Batteri patogeni delle feci delle blatte.

1ª serie *B. coli.* . .	B. tifosimile (2 stipiti)						
2ª serie *B. coli.* . .	B. tifosimile	B. proteisimile					
3ª serie *B. coli.* . .	..	B. proteisimile	B. del pseudo-ed.	Streptoc.	Stafil. aur.		
4ª serie *B. coli.* . .	B. tifosimile		..	..	..	B. similcarbonchio	B. fluor. non liquef.

§ 5. — Studio dei germi patogeni isolati.

a) *Bact. coli.* — Questo germe apparve costantemente nelle feci delle blatte, come già avevo osservato nel primo lavoro, o per lo meno si trova nelle feci di tutte le serie di blatte. Nè la cosa è strana data l'enorme diffusione di esso e l'ambiente ove vivono le blatte; esso fu del resto ritrovato nelle feci di quasi tutti gli animali inferiori e superiori.

Il Kürster, esaminando il contenuto intestinale di ogni singola blatta, non trovò il *b. coli* nelle feci di tutti gli insetti, ma egli non esaminò che il contenuto di 21 blatte; il suo metodo è indubbiamente più esatto, ma l'importanza di tali determinazioni è relativa. Io invece, tenuto conto che le blatte vivono in colonie in uno stesso luogo, d'onde poi si spargono nottetempo per tutta la casa, ho preferito esaminare complessivamente il contenuto di ogni singola serie di blatte della stessa provenienza, che costituiva in certo modo una media dell'inquinamento dell'ambiente abitato dagli insetti. Il Küster nell'esaminare il contenuto intestinale di sole 21 blatte, si limitò a un numero troppo esiguo per trarne conclusioni attendibili; non dice se i 21 insetti fossero di diversa provenienza, il che fa credere che provenissero da uno stesso sito, e faceva delle piastre raccogliendo le feci dalle scatole di vetro, contando sull'azione della luce e del disseccamento per la distruzione dei germi provenienti dall'aria o dagli integumenti degli insetti, senza pensare che tale azione, su la

efficacità della quale non poteva egli contare che quando si fosse assicurato della secchezza dell'ambiente (mentre le scatole che contengono le blatte sono sempre umide) e non avesse dato in pasto che cibi secchi (mentre somministrava cibi umidi e i residui di essi potevano favorire la cultura di germi accidentali) poteva esplicarsi anche su una porzione delle feci, quelle prima emesse. Ora avrebbero potuto così molti *B. coli* che verisimilmente, come fu osservato nelle feci dell'uomo e degli altri animali, erano in maggior copia alla superficie delle feci formate, essere distrutti o aver perduto tanto della loro vitalità, da non svilupparsi in concorrenza con altri germi più vitali. In ogni caso solo l'esame del contenuto intestinale, prelevato direttamente con la sezione dell'insetto o la raccolta diretta delle feci, provocandone l'emissione con la pressione addominale, avrebbe potuto avere valore probatorio.

Certo è che la presenza del *B. coli* nelle feci a me apparve costante anche dopo un lungo digiuno degli insetti, o un prolungato vitto sterile, o un'alimentazione con patine culturali di altri microrganismi, tanto in questa serie di esperienze, che in quelle fatte in altra città, a molti anni di distanza.

Non sempre isolai una forma tipica di coli e spesso facendo dalle piastre per strisciamento in agar di molte colonie, adoperando tubi di agar preparato nello stesso giorno, ottenevo delle colture talora differenti, e le differenze apparivano più spiccate nelle culture in gelatina. Talora ottenevo delle forme quasi rotonde, talora erano in prevalenza le forme nettamente bacillari, talora le colonie erano piatte e tenui da somigliare quasi a quelle dei tifosimili, talora apparivano rilevate, a patina opaca, splendente. Talora si aveva nelle culture in agar o in gelatina produzione di bollicine gassose.

Tutti gli stipiti di *B. coli* di cui ebbi a saggiare il potere patogeno apparvero virulenti, ma il potere patogeno non era costante, nè confrontando i vari stipiti fra di loro, nè tampoco negli stipiti simili isolati dalle stesse blatte a vari periodi. Così di solito apparivano assai virulenti gli stipiti isolati dalle feci delle blatte appena portate all'Istituto e quando il contenuto batterico delle feci era molto ricco. Man mano che il digiuno o il vitto sterile impoveriva di specie microbiche le feci, le stesse forme di *B. coli*, che prima producevano, negli animali, la morte con un reperto anatomopatologico di setticemia, non davano più che semplici lesioni locali, talvolta anche senza uccidere gli animali.

Ma su le diverse condizioni che modificano la virulenza del *B. coli* ritornerò più innanzi.

b) *Bacilli tifosimili.* — Le forme di bacilli tifosimili, pure senza essere costanti nel contenuto intestinale delle blatte, sono ciò nonpertanto frequentissimi. Su quattro serie di blatte se ne riscontrarono in tre. Se ne isolarono parecchi stipiti con colonie più o meno tenui, più o meno irregolari, con filamenti più o meno lunghi. Solo uno stipite si distingueva abbastanza nettamente dagli altri, anche dai caratteri colturali, perchè dava luogo, anche in gelatina, a una patina più spessa del solito e a una minore iridescenza delle colonie.

Anche il potere patogeno non era costante nei vari stipiti, alcuni, inoculati in coltura pura, davano forme di setticemia, altri davano luogo a semplici fenomeni locali. Alcuni non erano patogeni che per le cavie, altri lo erano anche per i conigli.

Nelle blatte tenute a digiuno o a vitto sterile, i bacilli tifosimili resistevano molto a lungo, ma vi si mostravano attenuati.

c) *Bacilli proteisimili.* — Ne isolai tre stipiti, poco distinti l'uno dall'altro e molto simili al *Proteus vulgaris.* Uno di questi designato come *b. proteisimile B* fu isolato tanto dalle piastre delle feci della seconda serie di blatte, che dalla milza e dal sangue del cuore della cavia inoculata con le feci di questa serie. Ma coltivato e inoculato in coltura pura, parecchie volte, a cavie e a conigli, non ne produsse la morte. O si trattava quindi di una forma già attenuata, la virulenza della quale si era transitoriamente esaltata in simbiosi con gli altri microrganismi, o di una forma patogena attenuatasi rapidamente nei primi giorni dell'isolamento. Era un bacillo mobile, che dava filamenti più o meno lunghi, con forme involutive quasi coccacee, asporigeno, non resistente al Gram, che fondeva la gelatina e non coagulava il latte, pur comunicandogli un odore assai sgradevole. Su patata dava una patina giallastra, spessa, con molte forme involutive. In agar dava sviluppo a una patina tenue, frangiata, umidiccia, lievemente iridescente.

Un altro stipite, *b. proteisimile C*, fu isolato dalla milza del coniglio morto in seguito all'inoculazione delle feci della terza serie di blatte, mentre non si isolò dalla cavia inoculata con le stesse feci.

Inoculato in cultura pura nel coniglio, esso dava la morte dopo 5-6 giorni, senza note anatomopatologiche spiccate, ma con un ascesso al sito d'inoculazione. Le cavie inoculate morivano sempre senza note anatomopatologiche di rilievo, dopo 7-10 giorni, ma costantemente. Somigliava assai per i caratteri colturali al precedente, da cui si distingueva per una maggiore mobilità e per una patina più spessa e punto iridescente.

Nei passaggi successivi conservò la sua virulenza per 5 mesi.

d) *B. del pseudoedema maligno.* — Non fu isolato che una volta dalle feci di una serie di blatte, la terza, e non ne fu difficile l'identificazione. Era molto virulento e conservò la sua virulenza per molti mesi, nei successivi passaggi, ma scomparve ben presto dalle feci delle blatte tenute nelle camere umide.

e-f) *Streptococco piogene. Stafilococco aureo.* — Anche questi germi si isolarono una sola volta; erano di mediocre virulenza e inoculati in coltura pura non provocarono che suppurazione locale, scomparvero ben presto dalla piastra delle feci.

g) *Bacillo similcarbonchio.* — Anche a Messina, come già a Cagliari, apparve in una serie di blatte una forma bacillare molto simile a quella del bacillo carbonchioso. E una forma simile isolò anche il Küster ad Heidelberg (43).

Questo bacillo dava sviluppo nelle piastre a colonie identiche a quella del carbonchio ematico, con lo sviluppo caratteristico a testa di Medusa e con filamenti circonvoluti, che si allontanavano dalla colonia, spingendosi tortuosamente su la superficie del terreno di nutrizione. Coltivato in goccia pendente di brodo, tanto all'ambiente che in stufa, apparivano leggermente mobili; le colture in agar e in brodo non si differenziavano da quelle del carbonchio; le colture in gelatina fondevano rapidamente a imbuto il substrato con deposito fioccoso al fondo. E' sporigeno; le spore resistono per 3 minuti ai vapori d'acqua bollente.

Per quanto riguarda il potere patogeno, ho già notato più sopra come l'inoculazione sottocutanea della brodo-cultura di 24 ore (1 cmc.) uccidesse in 40 ore circa una cavia di 400 grammi, e in circa 48 ore un coniglio di 750 grammi di peso; mentre il reperto necroscopico corrispondeva esattamente a quello del carbonchio ematico. Il potere patogeno di questo germe si mantenne costante per molti mesi, nei successivi passaggi delle culture.

h) *B. fluorescens liquefaciens.* — Fu isolato dalle feci delle blatte della 4ª serie; uccideva le cavie dopo 2-3 giorni con un reperto anatomopatologico poco caratteristico; ma si riprendeva sempre dal sangue e dalla milza.

Esso apparve meno virulento per i conigli, nei quali le inoculazioni sottocutanee provocarono solo suppurazione alla sede dell'inoculazione e nella porzione declive della parete addominale. Questo germe non scomparve dalle feci delle blatte tenute a digiuno o a vitto sterile, che dopo tre mesi, e si mostrò durante questo periodo di una minore virulenza.

§ 6. — Condizioni di virulenza dei germi patogeni, in rapporto a variazioni della dieta degli insetti.

Il fatto di avere riscontrato nelle feci delle blatte, dotate di squisito potere patogeno, alcune specie batteriche che di solito ne sono sprovviste, costituiva già per me una notevole conferma delle ricerche di alcuni anni addietro, e dovevo quindi, almeno per analogia, ritenere che si trattasse di saprofiti comuni che avessero acquistato nell'intestino delle blatte le loro proprietà patogene. Ma prima di accingermi a studiare quali potessero essere i fattori di questo fenomeno, era interessante vedere se era possibile ottenere, come già altra volta, che germi banali dati in pasto agli insetti acquistassero nel loro intestino il potere patogeno.

Constatata perciò, con l'iniezione sottocutanea di tutta una cultura di agar, ed endovenosa di 1 cmc. di brodocultura di 24 ore, l'assoluta innocuità di molte specie batteriche saprofitiche, con le patine delle culture in agar alimentava le blatte affamate, porgendole loro con l'ansa di platino, con la stessa tecnica seguita nelle esperienze anteriori.

Per queste esperienze prendevo dei gruppi di 4-6 blatte, di cui avevo già studiata la flora microbica intestinale, e che avevo tenute a digiuno per lo meno un mese, facevo di nuovo delle piastre delle feci e ne saggiavo di nuovo il potere patogeno, e dopo alimentate con le colture batteriche le riponevo in una scatola di Petri sterile.

Dopo qualche giorno, saggiavo di nuovo la virulenza delle feci, raccolte asetticamente, con la tecnica più su esposta, e inoculavo le culture pure dei germi isolati.

Sperimentai così con parecchi stipiti di bacilli fluorescenti isolati da vari mezzi, con bacilli similcarbonchio, con bacilli *megatherium*, *radiciformis*, *subtilis*, *proteus*, con sarcine e con qualche germe patogeno attenuato.

Contemporaneamente le blatte erano mantenute prive di cibo, o erano alimentati con diete speciali.

1. *Blatte nutrite con le sole patine culturali*; dopo un digiuno assoluto di circa 45 giorni. Nelle piastre delle feci non si sviluppano batteri fluorescenti.

L'inoculazione delle piastre *in toto* non provoca nelle cavie che una suppurazione locale da *B. coli* (puntura dell'ascesso), ma senza uccidere l'animale.

Si dà in pasto a queste blatte, per cinque giorni consecutivi, la patina culturale di un bacillo fluorescente isolato dalle feci di un piccione (*B. fluorescens liquefaciens* C) di cui avevo constatato già l'assoluta innocuità.

Le feci raccolte asetticamente, con l'espressione addominale, quattro giorni dopo, uccide una cavia in 5 giorni con produzione d'un ascesso al sito d'inoculazione. Dal pus si isola il bacillo fluorescente, che inoculato in cultura pura, sottocute, appare patogeno e uccide una cavia e un coniglio rispettivamente in 4 e 7 giorni, con produzione di vaste raccolte purulente.

Altre blatte nella stesse condizioni delle prime sono nutrite con un altro stipite (*B. fluorescens liquefaciens* D) isolato da un infuso di carne in putrefazione.

Dopo 8 giorni le feci inoculate uccidono una cavia in 7 giorni, con produzione di ascesso alla sede dell'innesto. Il bacillo fluorescente isolato dalle feci apparì patogeno in egual grado.

Un terzo stipite (*B. fluorescens liquefaciens* E), isolato dall'aria, somministrato alle blatte per 8 giorni non acquista affatto virulenza.

Un quarto stipite (*B. fluorescens liquefaciens* F), isolato da un terreno in cui vivevano molti lombrici, acquista nell'intestino delle blatte un notevole potere patogeno. Le feci divengono virulente, e il germe isolato dalle piastre e inoculato in coltura pura uccide una cavia in 54 ore, con edema sottocutaneo, milza mediocremente ingrandita, presenza del bacillo nel sangue.

Un bacillo fluorescente non fondente (*B. fluorescens non fluidificans* C) proveniente dalle feci di una cavia, non conferisce potere patogeno alle feci delle blatte che ne furono alimentate.

L'inoculazione della cultura pura del bacillo, riisolato dalle feci riesce innocua.

Un altro stipite (*B. fluor. non liq.* D) isolato dal terreno conferisce invece un moderato potere patogeno alle feci delle blatte (produzione di ascesso, e morte della cavia).

L'inoculazione della brodocultura uccide la cavia dopo 4 giorni, con produzione di un vasto ascesso sottocutaneo. Dal pus e dalla milza si coltiva il germe inoculato.

Due bacilli similcarbonchio (stipiti C e D) isolati dal terreno il primo e dalle feci di una *Calliphora vomitoria* l'altro, non acquistarono potere patogeno col passaggio nell'intestino delle blatte.

Lo stesso avviene di due sarcine e di un *B. radiciformis*.

Furono pure amministrate alle blatte delle culture del bacillo di colera dei polli e di vibrione di Metchnikoff, attenuatesi spontaneamente, nei successivi passaggi, e del bacillo del carbonchio, coltivato per 15 giorni in brodo a 45° che era divenuto asporigeno e completamente avirulento. Riisolati dalle feci, questi germi appaiono sprovvisti di potere patogeno; il bacillo del carbonchio non vi riacquista il potere di sporificare.

Appare quindi da queste esperienze, che nelle blatte a digiuno, con feci avirulente, alcuni germi saprofiti, passando a traverso il loro intestino, senza altro cibo, vi acquistano un limitato potere patogeno (B. fluorescens liquefaciens *C, D, F*: B. fl. n. liq. *D*); *altri, e sono i più, non acquistano alcun potere patogeno, i germi patogeni attenuati non vi riesaltano la loro virulenza.*

2. *Blatte nutrite con patine culturali e pane sterile.* Mi servii per queste esperienze di blatte tenute a lungo a digiuno e con feci avirulente e assai povere di germi.

Dalle piastre delle feci isolo il *B. coli* per saggiarne la virulenza e constato che l'inoculazione della coltura produce solo un ascessolino sottocutaneo, senza uccidere le cavie.

Queste blatte furono nutrite con gli stessi germi, di cui nelle esperienze precedenti, somministrando contemporaneamente della mollica di pane sterilizzata con acqua, e i risultati furono press'a poco identici.

Acquistarono un limitato potere patogeno gli stipiti C, D e F del *B. fluorescens liquefaciens*, gli altri rimasero sprovvisti di potere patogeno anche dopo ripetuti passaggi.

Il *B. coli* riisolato dalle feci apparve sempre attenuato.

3. *Blatte a dieta di latte acido.* Le feci, previamente esaminate, sono avirulente, le piastre assai povere di colonie.

Dopo la dieta di latte acido, l'inoculazione delle feci provoca un ascesso nelle cavie senza ucciderle; le piastre sono molto ricche di colonie, ma non contengono bacilli fluorescenti.

Contemporaneamente si somministrano ai vari gruppi di blatte, per 8 giorni, il *B. fluorescens liquefaciens* D e E, il *B. fluorescens non liquefaciens* E, il bacillo similcarbonchio C, la sarcina gialla C, il *B. radiciformis*. Questi germi si riisolano dalle piastre delle feci e si inoculano.

Solo il bacillo fluorescente e fondente D ha acquistato un moderato potere patogeno.

4. *Dieta di latte putrido.* L'inoculazione di 1 cmc. di tale latte non provoca alcuna reazione nelle cavie. Dopo la dieta, le feci delle blatte rimangono avirulente, ma le piastre sono ricche di colonie, e inoculate *in toto* provocano la produzione di piccoli ascessi di *B. coli*.

Le piastre del latte mostravano la presenza di bacilli fluorescenti, i quali appaiono pure nelle piastre delle feci, ma non hanno acquistato potere patogeno.

A vari gruppi di blatte si somministrano i fluorescenti e fondenti *A*, *B* (provenienti dalle blatte stesse, v. sopra) *C*, *D*, *E*, *B. fluorescens non liquefaciens A*, *B*, *D* e il bacillo similcarbonchio *D*. Solo le feci delle blatte nutrite con gli stipiti *C* e *D* del *B. fluor. liquef.* hanno acquistato il potere di uccidere le cavie con produzione di un ascesso sottocutaneo.

Non si saggia il potere patogeno dei vari bacilli fluorescenti sviluppatisi nelle piastre perchè non si potrebbe determinare quali di essi provengono dal latte e quali dalle culture somministrate.

5. *Dieta di uovo fradicio*; di cui l'inoculazione diretta non rivela l'esistenza di germi patogeni.

Dopo tale pasto le feci delle blatte, prima avirulente, hanno acquistato il potere di produrre ascessi nelle cavie. Il pus contiene il *B. coli*, poco virulento, il quale, sia esso lo stipite già esistente nell'intestino dell'insetto, o altro proveniente dall'uovo, appare avere acquistato un certo potere patogeno.

Si somministrano ai vari gruppi di blatte gli stipiti *C*, *D*, *F* del *B. fluorescens liquefaciens*, il *B. fluorescens n. liquefaciens D* il similcarbonchio *D* e *C*, la sarcina gialla *D*, la sarcina alba *D*, il bacillo del carbonchio attenuato.

Poichè nè le feci delle blatte, nè le piastre dell'uovo contenevano fluorescenti si poterono isolare dalle piastre i vari fluorescenti somministrati.

Gli stipiti *D* e *F* del *B. fluor. liquefaciens* isolato dalle feci provocano ascessi locali nelle cavie senza ucciderle.

Il bacillo similcarbonchio *D* uccide una cavia dopo 4 giorni con produzione di un ascesso al sito dell'inoculazione.

Gli altri saprofiti si mantengono sprovvisti di virulenza. Il bacillo del carbonchio attenuato non riacquista la virulenza nè il potere di sporificare.

6. *Dieta di carne fresca,* non contenente germi patogeni.

Le piastre delle feci, inoculate, dopo qualche giorno provocano un ascesso da *B. coli,* senza uccidere l'animale. Probabilmente è il *B. coli* ospite abituale delle blatte, che ha riacquistato una debole virulenza.

Ai vari gruppi di blatte si somministrano gli stipiti *B, C, E, F* del *B. fluorescens liquefaciens,* gli stipiti *D E* del *B. fluorescens n. liquef.*, il similcarbonchio *D,* la sarcina lutea *D,* il vibrione di Metchnikoff attenuato.

Lo stipite *F* del *B. fluorescens liquefaciens* acquista un moderato potere patogeno, poichè inoculato dopo il passaggio nelle blatte, uccide una cavia dopo, 5 giorni con produzione di un ascesso al sito d'inoculazione. Gli altri saprofiti rimangono sforniti di virulenza; il vibrione di Metchnikoff non riesalta la sua virulenza.

7. *Dieta di carne in avanzata putrefazione.* L'inoculazione di un pezzetto di carne in una saccoccia sottocutanea di una cavia, provoca una infiltrazione che poi si riassorbe, senza rivelare la presenza di germi patogeni.

Le feci delle blatte così nutrite appaiono molto ricche di colonie. L'inoculazione di esse *in toto* uccide una cavia dopo 4 giorni, con produzione di un vasto ascesso locale, da cui si isolano il *B. coli* e un bacillo tifosimile, che inoculati uccidono due cavie dopo 5 e 7 giorni, con lo stesso reperto di suppurazione locale.

Pare che i bacilli fluorescenti, che appaiono numerosi dall'esame delle piastre, non abbiano acquistato potere patogeno. Si somministrano alle blatte i bacilli fluorescenti e fondenti *D* e *F,* il non fondente *D,* i similcarbonchio *C* e *D,* uno stipite di *B. subtilis,* le sarcine *alba C* e *lutea C,* il bacillo del carbonchio attenuato.

Non isolo i bacilli fluorescenti dalle feci non potendo identificarli. Le feci delle blatte nutrite col *B. fluorescens liq. D* provocano un ascesso in una cavia che muore dopo 9 giorni.

Il similcarbonchio *D* isolato dalle piastre è pure divenuto piogene; gli altri germi non appaiono modificati.

8. *Dieta di pane con urina in fermentazione ammoniacale.* Le piastre delle feci delle blatte nutrite col pane imbevuto di urina appaiono molto ricche di germi. L'inoculazione delle colonie *in toto* riesce innocua. Si somministrano le patine culturali dei bacilli fluorescenti e fondenti C, E, F, il *B. fluorescens non liquefaciens* D, le sarcine *alba* C e *lutea* C. Solo il *B. fluorescens liquefaciens* F acquista nel passaggio a traverso l'intestino potere piogeno, gli altri non si modificano.

9. *Dieta di feci umane* contenenti dei *B. coli* e dei bacilli tifosimili, che uccidono le cavie.

L'inoculazione delle feci delle blatte, dopo otto giorni dal pasto, provoca nelle cavie una setticemia da *B. coli* e da tifosimili.

Si somministrano ai vari gruppi di blatte il b. similcarbonchio D e quello E, un bacillo ***megatherium***, la sarcina ***lutea*** C, la sarcina ***aurantiaca;*** non si somministrano dei bacilli fluorescenti. Solo il bacillo similcarbonchio D vi acquista discreto potere patogeno e ripreso e inoculato in cultura pura uccide le cavie in 3 giorni, con note anatomopatologiche poco spiccate, ma presenza del bacillo nel sangue e nella milza.

Si somministra anche il bacillo del carbonchio attenuato, e si vede che esso riacquista in parte la sua virulenza, e dopo il passaggio esso è divenuto capace di uccidere le cavie in 5ª giornata, senza le note anatomopatologiche caratteristiche del carbonchio; dalla milza tuttavia si riisola il b. del carbonchio, che ha riacquistato il potere di sporificare.

Da queste esperienze risulta che alimentando le blatte con varia dieta, sia con cibi sterili che con cibi non sterilizzati, freschi o in decomposizione spontanea, con feci o con urina, alcuni stipiti di saprofiti vi assumono un potere patogeno poco spiccato, mentre altri stipiti non si modificano affatto, come del resto non si modificano affatto la maggior parte dei germi saprofiti dati in pasto.

Più frequentemente acquistano potere patogeno alcuni stipiti di B. fluorescens liquefaciens *e di bacillo similcarbonchio, che sono gli stessi che assumevano già un certo grado di virulenza passando a traverso l' intestino delle blatte senz'altro cibo. Riprendono pure un certo grado di virulenza variabile alcuni germi patogeni attenuati, già esistenti nell' intestino delle blatte* (B. coli *e bacilli tifosimili*) *o somministrati loro col cibo* (*b. del carbonchio*) *se il vitto non è sterile o è in decomposizione spontanea, o con vitto di feci.* —

Un potere patogeno più squisito acquistarono alcuni saprofiti passando a traverso l'intestino delle blatte, contemporaneamente a certe sostanze chimiche.

Preparati degli infusi putridi di carne di manzo o di vari organi, e di peptone, dopo qualche mese decantavo la parte liquida e la sterilizzavo esponendola per un'ora a 80° insieme con della mollica di pane. Poi somministravo questo cibo alle blatte digiune, che lo mangiavano avidamente, correndo tosto in direzione dell'ansa di platino con la quale lo si porgeva loro.

Contemporaneamente a questo cibo somministravo alle blatte le varie patine culturali.

10. *Dieta di pane con infuso putrido di fegato di manzo.* Le feci delle blatte, prima assai povere di germi e avirulente, dopo 10 giorni di una simile dieta, davano delle piastre piene di colonie e inoculate uccidevano costantemente le blatte e i conigli con una setticemia da *B. coli* e da bacilli tifosimili, che, già esistenti nel loro intestino, ma attenuatisi spontaneamente col digiuno, riacquistavano la loro virulenza.

Avendo adoperato per queste esperienze alcune blatte della 4ª serie, che contenevano nell' intestino ancora b. similcarbonchio B e il *b. fluorescens*

non liquefaciens B attenuatisi spontaneamente, dopo la dieta putrida isolai i detti germi dalle piastre delle feci e li inoculai in cultura pura.

Anch'essi avevano riacquistato il potere patogeno perduto: il bacillo similcarbonchio riprodusse il quadro tipico della setticemia che aveva prodotto nei primi tempi del soggiorno delle blatte nel laboratorio, con intenso edema sottocutaneo e cospicuo tumore di milza; il *B. fluorescens n. liquef.* uccise una cavia in 5ª giornata, senza un vistoso reperto anatomo-patologico, ma con presenza del bacillo nel sangue.

Si somministrarono a queste blatte parecchi saprofiti.

Il *B. fluorescens liquefacens* F, acquistò rapidamente un notevolissimo potere patogeno.

Un cmc. di brodocultura di 24 ore, inoculato sotto la cute delle cavie e dei conigli li uccise costantemente in 36-60 ore, con un reperto anatomopatologico caratteristico, edema abbondantissimo al sito d'inoculazione, discreto tumore di milza, invasione del bacillo nel circolo (*).

Il *B. fluorescens liquefacens* D, acquistò pure col passaggio a traverso l'intestino delle blatte un notevole potere patogeno: esso uccise le cavie in 3-4 giorni e all'autopsia si rilevò un'infiltrazione leucocitaria della sede dell'innesto, punto tumore di milza, bacilli nel sangue circolante.

Il *B. fluorescens liquefacens* C, dopo il passaggio nelle blatte uccise le cavie in un periodo di 6-10 giorni, con suppurazione al sito dell'inoculazione. Dal pus si riisolò il bacillo inoculato.

Lo stesso reperto dettero il *B. fluorescens liquefaciens* E e il *B. fluorescens non liquefaciens* D. Il *B. fluorescens non liquefaciens* C, invece, non acquistò affatto potere patogeno, neanche dopo ripetuti passaggi. Con ripetuti passaggi si riescì invece ad esaltare la virulenza dei fondenti C e E, che con un solo passaggio avevano acquistato solo proprietà piogene, fino a produrre una setticemia rapidamente mortale, con intenso edema gelatinoso e tumore di milza.

Il bacillo proteisimile D, acquistò un potere patogeno così intenso da uccidere le cavie in 2-3 giorni con un reperto di setticemia acuta.

Il bacillo similcarbonchio D divenne fortemente patogeno; esso uccise le cavie in 24-30, ore con edema gelatinoso sanguinolento, tumore di milza, bacilli in circolo.

Il bacillo similcarbonchio C acquistò potere patogeno meno spiccato; gli animali inoculati morirono dopo 7-11 giorni con suppurazione alla sede dell'inoculazione.

Un bacillo sottile, la *Sarc. aurantiaca*, la *S. lutea* C, acquistarono uno scarso potere patogeno provocando piccoli focolai da suppurazione locale, ma senza uccidere costantemente gli animali.

Il *B. radiciformis*, Il *B. megatherium*, la *Sarc. alba* C e la *Sarc. lutea* D non acquistano potere patogeno.

Il bacillo del carbonchio attenuato dopo un passaggio (dopo 10 giorni

---

(*) Il *B. fluorescens liquef.* F divenne tanto virulento, che avendo posto per errore un coniglio inoculato nella stessa gabbia con 4 conigli sani, provocò in essi un'epidemia che li uccise tutti, uno dopo l'altro, col reperto necroscopico caratteristico. Dal sangue di tutti i conigli s'isolò il *B. fluorescens liquefaciens*.

dal pasto) riacquistò una certa virulenza; esso uccise le cavie dopo 4-5 giorni, ma senza il reperto necroscopico tipico. Ma dopo quattro passaggi esso riacquistò la virulenza primitiva e il potere di sporificare.

Il vibrione di Metchnikoff riacquistò la sua virulenza per le cavie. Il *b.* del colera dei polli riesaltò solo in parte la perduta virulenza, ma non si potè seguire in un secondo passaggio.

11. *Dieta di pane con infuso putrido di peptone* 1 %. Gli stipiti D e F del *B. fluoresc. liquef.* acquistano il potere di provocare una setticemia rapidamente mortale, con edema gelatinoso e tumore di milza.

Scarso potere patogeno acquistano gli stipiti C e E e gli stipiti C e D del *B. fluorescens non liquefaciens.*

Il b. similcarbonchio D uccide le cavie con un reperto in tutto simile a quello del carbonchio, in 36-40 ore; lo stipite C le uccide in 4 giorni, ma senza produzione di edema e di tumore di milza.

Il bacillo proteisimile C uccide le cavie in 48-60 ore con reperto di setticemia acuta.

Il *B. subtilis,* la *Sarc. lutea* C e D, la *Sarcina aurantiaca,* uccidono gli animali in 5-9 giorni, con suppurazione locale. Dal pus si riisolano i germi inoculati.

La *S. alba* C e D, il *B. radiciformis,* il *B. megatherium* non acquistano affatto potere patogeno, neanche dopo ripetuti passaggi.

Riacquistano completamente la loro virulenza il b. del carbonchio e il v. di Metchnikoff.

12. *Dieta di pane con infuso putrido di carne di manzo.* Acquistano un notevole potere patogeno il *B. fluor. liq.* F, e il *B.* similcarbonchio D.

Divengono mediocremente patogeni i bacilli *fluorescens liquef.* C e D, il bac. *fluorescens non liquef.* C e D e il bac. proteisimile C.

Scarso potere patogeno acquistano il *B. fluorescens liquef.* E, la *Sarc. lutea* C e la *S. aurant.*

Il b. del carbonchio e il v. di Metchnikoff attenuati non riacquistano la loro virulenza che dopo ripetuti passaggi.

La *S. alba,* C e D, la *Sarc. lutea* D e B, il *B. subtilis,* il *B. radiciformis* non acquistano potere patogeno.

13. *Dieta a reazione fortemente acida o alcalina.* Nel lavoro precedente aveva ricercato quale influenza avesse su la virulenza dei germi che attraversavano l'intestino delle blatte la reazione dei cibi, somministrando frutta acidule, e non aveva constatato un'azione speciale di una tale dieta. Volli perciò vedere se una reazione dei cibi acida o alcalina molto manifesta, tale cioè da irritare vivamente l'epitelio intestinale degli insetti potesse esercitare un'azione spiccata sul contenuto batterico dell'intestino delle blatte.

Alimentai perciò delle blatte con pane sterile imbevuto di una soluzione di carbonato di sodio al 5 %, e dopo 7 giorni cominciai a somministrare le patine culturali. In tali condizioni il *B. fluorescens liquef.* F acquista un discreto potere patogeno, il *B. fluor. liquef.* C e E e il *B. fluor non liquef.* C e D, il *B. subtilis* e *radiciformis* rimangono completamente sforniti di potere patogeno. Scarso potere patogeno acquista anche il similcarbonchio D.

Il bacillo del carbonchio e il v. di Metchnikoff attenuati non si riesaltarono.

Provai a somministrare una soluzione più concentrata del sale alcalino, ma allora le blatte rifiutavano il cibo.

Ad altre blatte somministrai il pane con una soluzione di acido tartarico al 5 %, somministrando le patine batteriche dopo 8 giorni.

Le piastre delle feci riuscivano così molto rade.

Il *B. fluor. liquef.* C e F e il b. similcarbonchio D vi acquistarono uno scarso potere patogeno (suppurazione locale e morte in 7-11 giorni). Il *B. fluor. liq.* E, il *B. fluorescens n. liquef.* D, il similcarbonchio C, la sarcina lutea C rimasero privi di potere patogeno.

Volli pure provare a somministrare ad altre blatte, alternativamente. per un periodo di tre settimane, un giorno il pane acidificato, e un giorno quello alcalino. Dei saprofiti somministrati contemporaneamente i bacilli *fluorescens liquefaciens* C e F e il bacillo similcarbonchio D divennero capaci di uccidere la cavie in 4-5 giorni con scarso edema sottocutaneo, punto tumore di milza, bacilli in circolo.

Il *B. fluorescens liquefaciens* D e il bacillo proteisimile C acquistarono il potere di provocare ascessi al sito d'inoculazione e di uccidere gli animali in 6-7 giorni. Il *B. fluorescens non liquef.* D acquistò semplici proprietà piogene. Il *B. subtilis*, la *Sarc. lutea* D e la *Sarcina aurantiaca* rimasero sprovviste di qualsiasi potere patogeno.

Il bacillo del carbonchio attenuato non riacquistava la virulenza che fino a divenire piogeno.

Dalle esperienze su riferite appare che alimentando le blatte con infusi putridi, alcuni saprofiti già esistenti nel loro intestino acquistano quasi costantemente potere patogeno e divengono virulenti come il B. coli *e alcuni bacilli tifosimili. Acquistano notevole potere patogeno, passando attraverso all'intestino delle blatte così alimentate, alcuni stipiti di bacilli fluorescenti, proteisimili, similcarbonchio,* subtilis *e sarcine, dati in pasto alle blatte. Riesaltano la loro virulenza alcuni germi patogeni attenuati, bacillo del carbonchio, vibrione di Metchnikoff, bacillo del colera dei polli.*

Una dieta fortemente alcalina o fortemente acida, modifica pure l'ambiente intestinale delle blatte, in modo da far acquistare un certo potere patogeno ad alcuni saprofiti; e più squisito appare questo potere patogeno quando si somministra alternativamente la dieta alcalina e quella acida. (Cfr. Tav. II).

Tav. II. — *Potere patogeno acquistato dai vari saprofiti, o virulenza esaltata nei germi patogeni attenuati, col passaggio a traverso l'intestino delle blatte.*

Segni: ~ = non patogeno o non virulento; ✚ = lieve potere patogeno; ✱ = mediocre potere patogeno; ● = intenso potere patogeno.

DIETA DELLE BLATTE contemporanea alla somministrazione delle culture	B. fluorescens liquefaciens Stipiti						B. fluor. n. liquef. Stipiti			B. similcarbonchio Stipiti			Sarcina lut. Stipiti		Sarcina alba Stipiti		Sarcina aur.	B. subt.	B. proteus sim. Stipiti		B. radicif.	B. megath.	B. coli	B. tifosim.	B. del carb. atten.	B. del chol. dei polli atten.	Vibrione di Metchn.
	A	B	C	D	E	F	C	D	E	C	D	E	C	D	C	D			C	D							
Digiuno	..	..	✱	✱	~	●	~	✱	..	~	~	..	~	..	..	..	~	..	..	..	~	~	..	..	~	~	~
Pane sterile	..	..	✱	✱	~	●	~	~	..	~	~	..	~	~	..	..	..	..	..	..	~	~	..	..	~	..	~
Latte acido	..	..	..	✱	~	..	~	..	~	~	..	..	~	..	..	..	..	..	..	..	~	..	..	..	..	..	..
Latte putrido	~	~	✱	✱	..	..	..	~	..	..	~	..	..	..	.	..	..	..	..	..	..	..	~	..	..	..	..
Uovo fracido	..	..	~	✚	..	✱	~	✱	..	..	~	..	..	..	~	..	..	..	..	..	..	..	..	..	~	..	..
Carne fresca	..	~	~	..	~	✱	..	..	..	..	~	..	..	~	..	..	..	..	..	..	..	..	✚	..	..	..	~
Carne putrida	..	..	..	✱	~	..	..	~	..	~	✚	..	~	..	~	.	..	..	..	..	..	..	✱	✱	.	..	..
Urina	..	..	~	..	~	✱	..	~	..	..	..	..	~	..	~	..	..	..	~	..	..	..	..	..	..	..	..
Feci	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	✱	~	~	..	..	..	~	..	..	..	..	~	..	..	✱	..	..
Infuso di fegato	..	●	✚	✱	✚	●	~	✚	..	✚	●	..	✚	~	~	.	✚	✚	..	●	~	~	●	●	●	●	●
Infuso di peptone	..	..	✱	●	✱	●	✚	✱	..	✱	●	..	✚	✚	~	~	✚	✚	●	..	~	~	..	..	●	..	●
Infuso di carne di manzo	..	..	✱	✱	✚	●	✱	✱	..	..	●	~	✚	~	~	~	✚	..	✱	..	~	~	..	..	●	..	●

Visto come parecchi germi saprofiti acquistassero potere patogeno nel passare a traverso l'intestino delle blatte, era interessante vedere se questi germi potessero acquistare anche un tale potere, sottoposti a condizioni speciali *in vitro.*

Seguendo le esperienze su esposte si vede che non tutti i saprofiti sono capaci di assumere potere patogeno, non solo, ma che alcuni stipiti di un dato microrganismo divengono patogeni più facilmente e in grado più elevato di molti altri (p. e. il *B. fluorescens liquefaciens F* e il bacillo similcarbonchio *D*).

Quindi, evidentemente, nel fenomeno dell'acquisibilità del potere patogeno, entrano in campo da un lato delle peculiari attitudini di ogni singolo stipite ad acquistare un grado più o meno cospicuo di virulenza, dall'altro le condizioni di ambiente nelle quali questa virulenza è acquisita.

Ora quale parte, nei risultati delle mie esperienze, doveva attribuirsi all'uno e quale all'altro dei due fattori? Aveva maggiore importanza l'attitudine di ogni singolo microrganismo o stipite di microrganismo ad acquistare potere patogeno o il passaggio atraverso l'intestino dell'insetto? Una risposta a queste domande non potevano darla che i risultati di esperienze tendenti a rendere patogeni alcuni di questi microrganismi, indipendentemente dall'azione delle blatte, e *in vitro.*

Già lo Shaw (38), come accennai più sopra, avendo osservato un esaltamento della virulenza di alcuni germi patogeni attenuati, con ripetuti passaggi. in siero, *in vitro* attribuì quest'esaltamento a una selezione artificiale dei batteri che resistono all'azione battericida del siero.

A me non riuscì, malgrado ripetuti passaggi in siero di sangue di bue o in liquido ascitico umano, per oltre due mesi, di rendere patogeno alcuno stipite di *B. fluorescens liquefaciens* o *non liquefaciens*, di bacillo similcarbonchio o di sarcine.

Il Roncali (45) avrebbe osservato che la tetanotossina rende patogeni alcuni microrganismi. Allestite perciò delle colture in brodo di tetano, in fiaschetti, filtratele con la candela di porcellana, e saggiatone il potere tossico, le distribuii in tubi, asetticamente, per mezzo della mia bottiglia aspiratrice (46) e coltivai in essi i vari saprofiti, sia nel filtrato liquido che in agar al 20 % cui aggiungevo 1 cm. del filtrato. Ma neanche con passaggi molte volte ripetuti, mi riuscì di rendere patogeni i vari stipiti di *B. fluorescens liquefaciens*, nè di b. similcarbonchio.

Volli saggiare pure allo stesso modo dei terreni di nutrizione contenenti tossina difterica, ma non ebbi miglior risultato. E' noto che alcuni germi patogeni poco virulenti, esaltano la loro virulenza se coltivati in terreni di nutrizione contenenti prodotti solubili di bacilli saprogeni. Ma per quanto coltivassi ripetutamente i bacilli fluorescenti in brodo e in agar

contenenti il filtrato di brodoculture di *Proteus mirabilis* e di *P. vulgaris*, non mi riuscì di ottenere alcuno stipite dotato di potere patogeno.

L'Hueppe asserì di avere esaltato la virulenza del vibrione del colera coltivandolo anaerobicamente (*) Coltivai perciò in tal modo, i vari stipiti di bacilli fluorescenti e di b. similcarbonchio e il vibrione di Metchnikoff attenuato, ma non ottenni neanche a questo modo alcun acquisto di virulenza.

Il bacillo del colera dei polli attenuato, riprende, com'è noto, la sua virulenza in terreni di nutrizione contenenti 1-2 % di fosfato sodico; volli perciò saggiare anche quest'espediente, ma neanche esso valse a rendere patogeni i vari stipiti di bacilli saprofiti, nè a ridare la virulenza a un similtifo attenuato nel suo potere patogeno per le cavie.

L'esaltamento di virulenza dei batteri patogeni attenuati e l'acquisto di potere patogeno da parte dei saprofiti non poteva essere prodotto dalla simbiosi dei vari microrganismi esistenti nel canale intestinale delle blatte? Il Galtier (30) dimostrò che, negli animali, l'associazione batterica di due o più specie patogene tende ad elevare la virulenza dei singoli germi.

Coltivai perciò in brodo i bacilli fluorescenti, insieme con uno stipite virulento di bacillo piocianeo, riisolandoli poi dalle piastre e non inoculandoli che dopo essermi assicurato delle differenze del pigmento, in confronto alle culture isolate del bacillo piocianeo. I bacilli fluorescenti, anche trattati a questo modo, rimasero completamente sforniti di potere patogeno. Nè tampoco divennero patogeni, dopo coltivati in simbiosi con un proteo, con uno stipite virulento di *B. coli*, con un similtifo patogeno, nè col bacillo aerobio del pseudo-edema maligno. Ripetendo questi tentativi in condizioni di anaerobiosi non ottenni miglior risultato. Neanche un bacillo similcarbonchio, coltivato in terreni di nutrizione contenenti i prodotti solubili del bacillo del carbonchio, acquistò potere patogeno. Anche il Martoglio (35) del resto aveva eseguito senza risultato questa esperienza.

Preparai infine dei terreni di nutrizione di agar o di pappa di pane imbevuti di urina, di filtrato amicrobico di feci, di infusi putridi di fegato o di carne di manzo o di peptone all'1 %, e coltivai in essi i vari stipiti di *B. fluorescens liquefaciens* e *non liquefaciens*, di bacilli proteisimili, di bacilli similcarbonchio, di sarcina gialla e auranziaca Ma neanche con questo mezzo, dopo 10 passaggi, durante 40 giorni, ottenni alcuno stipite dotato del menomo potere patogeno. Nè in questi terreni di nutrizione riacquistava la perduta virulenza uno stipite di *B. coli* attenuato, isolato dall'intestino delle blatte, nè il bacillo di carbonchio, nè il vibrione di Metchnikoff attenuati.

Ho riferito sommariamente tutte queste esperienze, dato il loro risultato costantemente negativo.

Non si riesce quindi a rendere patogeni in vitro *i vari saprofiti (neanche quegli stipiti che più facilmente acquistano potere patogeno*

(*) Il Bajardi coltivandoli anaerobicamente insieme con prodotti solubili dello stafilococco piogene aureo, avrebbe ottenuto piogeni il *Micrococcus candicans* e il *M. aurantiacus* (39).

nell'intestino delle blatte, come il B. fluorescens liquefaciens F *o il b. similcarbonchio* D), *nè a ridare la virulenza ad alcuni germi patogeni attenuati, coltivandoli in anaerobiosi, in simbiosi con saprogeni, in terreni di nutrizione contenenti i prodotti solubili di batteri patogeni, o in infusi putridi di carne o di organi di animali, di feci o di urina. Non si deve quindi alle varie sostanze date in pasto alle blatte, l'acquisto di potere patogeno dei saprofiti, ma piuttosto a proprietà peculiari dei succhi o dei tessuti dell'insetto.*

§ 7. — Tentativi di conferire potere patogeno ai saprofiti « in vitro ».

Rimaneva da vedere se i soliti saprofiti presi in esame acquistassero potere patogeno coltivati *in vitro* in presenza delle sostanze con cui essi vengono a contatto nell'intestino dell'insetto.

Raccolsi perciò quanto più potei delle feci delle blatte nutrite a vitto sterile, o con infusi putridi, le stemperai in brodo e le distribuii in varj tubi sterili, seminando poi in questi tubi il *b. fluorescens liquefaciens F* e il b. similcarbonchio *D*, come quelli che avevano presentato la maggiore attitudine ad acquistare potere patogeno. Ma le culture di questi germi isolate dalle piastre apparvero sempre sfornite di potere patogeno.

Sezionate in seguito alcune blatte, ne isolai il canale alimentare insieme con le ghiandole annesse e le riposi in scatole di Petri sterili, e iniettai poi nel lume intestinale con un ago sottile, una gocciolina di brodocultura dei bacilli *fluorescens liquefaciens D* e *F* e del b. similcarbonchio *D*, conservando i pezzi in camera umida. Dopo qualche giorno, agitando l'intestino tagliuzzato in acqua sterile, allestii delle culture in piastra, e isolai di nuovo i due bacilli fluorescenti e il bacillo similcarbonchio; ma l'inocolazione delle brodoculture dimostrò che essi erano sprovvisti di potere patogeno.

Ricordando alcune esperienze del von Holub (47), che dimostravano come alcuni insetti viventi, fra cui i coleotteri, sono un buon substrato di cultura per alcuni microrganismi, tentai di rendere virulenti uno stipite di bacillo fluorescente (*B. fluor. liquefaciens F*) e uno di similcarbonchio (*D*), inoculandoli nel corpo delle blatte. Scelte a tal uopo alcune blatte delle più grosse e robuste, con un ago sottile iniettai nel loro corpo, fra due anelli toracici, una gocciolina di brodocultura di bacilli fluorescente e similcarbonchio. Dopo 3, 8, 15 giorni, sezionavo le blatte e dai tessuti isolavo. per mezzo di piastre o con strisciamento diretto nell'agar solidificata a becco di clarino, i germi inoculati. Ma inoculando le brodoculture potei constatare che questi germi non avevano acquistato il menomo potere patogeno.

L'acquisto di virulenza dei saprofiti o l'esaltamento della virulenza dei patogeni attenuati non avviene in vitro, *nè in contatto ai tessuti in-*

testinali tolti dagli insetti, nè in presenza del loro contenuto intestinale, come non avviene nel corpo delle blatte quando vi si iniettino le culture in brodo.

E poichè il fenomeno in questione non si verifica che nel tubo digerente dell'insetto vivo, ed è più manifesto in presenza di prodotti putridi, esso deve verisimilmente attribuirsi ai prodotti di ricambio dei microrganismi più o meno tossici e più o meno virulenti, esistenti nell'ambiente intestinale delle blatte, modificato dalle sostanze chimiche introdotte col cibo.

Mi propongo perciò in altra serie di ricerche di vedere come si comportano i saprofiti, passando a traverso all'intestino delle blatte, in presenza dei prodotti solubili dei vari microrganismi saprogeni e patogeni.

BIBLIOGRAFIA.

1. Cao. *Sul passaggio dei germi patogeni attraverso l'intestino di alcuni insetti.* L'Ufficiale Sanitario, anno IX, 1898.
2. Lepierre. *Etude d'un bacille fluorescent pathogène.* Ann. de l'I. Pasteur, 1895, n. 8.
3. Löwenberg. *Une sarcine pathogène.* Ann. de l'I. Pasteur, 1894, n. 4.
4. Schläfrig. *Ueber eine pathogene Sarcine.* Wiener klin. Wochenschrift, n. 42, 1901, p. 1025.
5. Bänzigen u. Silberschmidt. *Zur Aethiologie der Panophtalmie nach Hackensplitterverletzungen.* Ref. in Hyg. Rundschau, 1903, p. 934.
6. Polatti. *La Panoftalmite da B. subtilis.* Annali di oftalmologia, 1904.
7. Lorrain. *Étude bactériologique d'un cas de pleurésie putride.* Arch. de méd. expér. T. XIV, 1892, n. 6.
8. Brünig. *Ueber infektiösen fieberhaften Ikterus*, etc. Deutsche med. Woch., 1904, n. 35.
9. Hueppe u. Cartwright Wood. Berl. Klin. Woch, 1889, p. 347.
10. Schulz. Centralbl. f. Bakt., 1901, Bd. XXX, p. 582.
11. Borri. Hyg. Rundschau, 1894, p. 339.
12. Klein. Centralbl. f. Bakt. Bd. VI, 1889, p. 113.
13. Giannone. *Su di un bacillo similcarbonchio.* Lavori dell'Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo. Vol. V, p. 155.
14. Ottolenghi. *Ricerche sperimentali su tre bacilli simili al « B. anthracis »*, Atti dell'Accad. dei Fisiocritici, serie IV, vol. XV, 1903.
15. Sacquepée. *Infection secondaire par le « B. mesentericus », au cours de la fièvre typhoïde.* Ann. de l'Inst. Pasteur, 1901, n. 4, p. 281.
16. Lombardo-Pellegrino. *Sul contenuto batterico del sottosuolo di Messina.* Giornale della R. Soc. Ital. d'Igiene, 1903.
17. Id. *Su la morte spontanea degli animali di esperimento.* Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1906.
18. Guargena. *Sul passaggio dei germi del suolo attraverso l'intestino dei lombrici.* Questi Annali, 1906.
19. Ruzicka. *Vergleichende Studien ueber den « B. pyocianeus » und den « B. fluorescens liquefaciens ».* Archiv f. Hyg., Bd. XXXVII, p. 1.

20. GESSARD. *Essai sur la biologie du « B. pyocianique ».* Ann. de l'Inst. Pasteur, 1902.
21. MANFREDI. Rendiconti dell'Accad. dei Lincei, vol. III, 1887.
22. BINAGHI. *Dell'azione battericida del pus.* Riforma Medica, 1904
23. HUEPPE. Manuale d'Igiene, 1906 (Trad. ital.), p. 69 e *passim.*
24. ROGER. *Influence des produits solubles du « B. prodigiosus » sur l'infection charbonneuse.* Bull. de la Soc. de biologie, 1894.
25. VAILLARD e VINCENT. *Contribution à l'étude du tétanos.* Ann. Past., 1891 e segg.
26. MONTI. *Influenza dei prodotti tossici dei saprofiti sulla restituzione della virulenza ai microrganismi patogeni attenuati.* Rend. Accad. dei Lincei, 1889.
27. BESSON. *Contribution à l'étude du vibrion septique.* Ann. Pasteur, 1885.
28. MARX. *Bakteriolog. Mitteilung.* Archiv f. Klin. Chirurgie. Bd. LXII.
29. BERTARELLI. *Ricerche e osservazioni sulla biologia e sulla patogenicità del bacillo prodigioso.* Archivio per le scienze mediche. XXVII, 1903.
30. GALTIER. *Associations bactériennes, exaltations de virulence.* C. R. de l'Acad. d. Sc., 1894, 30 avril.
31. BECO. Centralbl. f. Allg. Path. u. Anat. Bd. VI, 1885, S. 16.
32 PAWLOWSKY. *Das Schicksal einigen Mikr. in den Tieren...* H. Rund, 1901, S. 8.
33. HISBERT. Hyg. Rundschau, 1899, p. 887.
34. VINCENT. *Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes.* Ann. Pasteur, 1898, p. 786.
35. MARTOGLIO. *Ricerche sull'azione patogena acquisibile dai microrganismi non patogeni.* Questi Annali, 1899, p. 449.
36. CASAGRANDI. *Relazioni fra bacilli metatrofi, paratrofi,* ecc. Questi Annali, 1900, p. 164.
37. HAMBURGER. *Ueber spezifische Virulenzsteigerung « in vitro ».* Ref. in Hyg R., 1904, p. 218.
38. SHAW. *On exaltation of bakterialvirulence bei passage « in vitro ».* Brit. med. Journ., 9 marzo 1903.
39. BAIARDI. *Sulle proprietà emolitiche dei filtrati,* ecc. Questi Annali, 1901, p. 393.
40. SANFELICE. *Untersuchung über anaerobe Mikrorganismen.* Zeitschr. f. Hyg., 1893, p. 339.
41. LAURENT. Annales de l'Inst. Pasteur, 1899, p. 304.
42. LEPOUTRE. *Recherches sur la transformation expérimentale de bactéries banales en races parassites des plantes.* Ann. Pasteur, 1902, p. 304.
43. KÜSTER. *Die Uebertragung bakterieller Infecktionen durch Insecten.* Inaug. Diss. Heidelberg, 1902.
44. SCHAUDINN. *Beiträge zur Kenntniss der Bakterien und verwandten Organismen.* Arch. f. Probistenkunde. Bd. I, 1902, p. 306.
45. RONCALI. Questi Annali, 1893, p. 117.
46. CAO. *Bottiglia aspiratrice per la raccolta del siero.* Giornale della Regia Soc. ital. d'igiene, 1903.
47. VON HOLUB. *Die Insekten als Lebenssubstrat für kultivirung ansteckender Krankheiten des Menschen und der Tiere.* Centr. f. Bakt. Bd. XXX, n. 7, S. 184.

ISTITUTO D'IGIENE E CLINICA PEDIATRICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Sull'assorbimento degli anticorpi specifici per la mucosa intestinale

per il dott. **OSVALDO FEDERICI.**

Grande importanza ha assunto in questi ultimi tempi lo studio della permeabilità del tubo gastro-enterico rispetto agli anticorpi, intesi nel senso generico, e molte ricerche nelle condizioni più svariate e con i più vari artifizi di tecnica furono intraprese dai numerosi osservatori che si interessarono dell'argomento.

La letteratura sull'argomento è molto ricca, ma, per i motivi esposti, per la vastità dell'argomento e per le difficoltà di questo genere di ricerche, i risultati sono ancora troppo discordi perchè possiamo farci un concetto esatto sul comportamento degli anticorpi nel tubo digerente.

V'è chi considera l'assorbimento possibile solo quando gli anticorpi vengano somministrati nel veicolo di sieri della stessa specie animale, di sieri cioè *omologhi* [Brieger ed Ehrlich (5), Ketscher (2), Salge (17)].

Un'altra categoria di osservatori lo crede possibile solo nei primi giorni dalla nascita, per la incompleta formazione dell'epitelio della mucosa gastro-enterica [Römer (16), Disse (15), Escherich (7), Behring (11-14), Uffenheimer (26)].

Alcuni altri sostengono l'assorbimento possibile per quelle sostanze da loro provate [Figari (24, 25) e Maragliano (9) per l'antitossina tubercolare, Minicis (4) per le antitossine difteriche, Vakulenko (8) per il tifo, Mercatelli (10) per il vaccino Haffkine, Vaillard (3) per gli anticorpi del colera, del tetano e del carbonchio]. Questi autori non escludono il passaggio anche per altre sostanze, mentre altri [Kraus (22), Uffenheimer (26)] sostengono il tubo digerente permeabile soltanto a certe categorie di anticorpi.

Un'ultima categoria di osservatori esclude completamente qualsiasi assorbimento della mucosa gastro-enterica [Carrière (6), Ferran, Chantemesse, Gibier (2)].

De Blasi, infine, pur sostenendo che il passaggio di anticorpi è massimo allorquando vengono somministrati col latte materno, e sopratutto se la mamma fu immunizzata attivamente, non esclude il passaggio anche in altre condizioni (2).

***

In mezzo a così forte disparità di vedute di tanti autori, riuscendo difficile potersi formare un concetto chiaro della questione, iniziai delle ricerche le quali ebbero per iscopo:

a) vedere se il passaggio delle antitossine nell'immunità passiva antidifterica avvenga attraverso la glandola mammaria della donna e in quali proporzioni;

b) ricercare questi stessi anticorpi nel sangue del poppante in diverse epoche dall'allattamento;

c) vedere se l'assorbimento si compia egualmente bene, ove gli anticorpi vengano somministrati in sieri omologhi ed eterologhi, tanto nell'uomo quanto nelle cavie;

d) sperimentare se l'assorbimento si compia anche all'infuori della prima età.

Le esperienze fatte in parte su nutrici e bambini, in parte su cavie, vennero eseguite dal luglio al dicembre 1905 nell' Istituto di igiene di Roma.

Le nutrici e i bambini furono scelti nell'Ambulatorio e nell' Infermeria « Soccorso e Lavoro », in dipenzenza della Clinica pediatrica.

SERIE *A*.

Eliminazione delle antitossine per il latte.

Scelsi per questo esperimento 8 nutrici di età variabile dai 21 ai 36 anni e tutte dal 2° al 10° mese di allattamento. A ciascuna di esse vennero fatte, con intervalli regolari di due giorni, tre iniezioni ipodermiche di siero antidifterico della casa Meister Lucius e Brüning. La dose per ciascuna iniezione variava da 1000 a 1500 U. I., sicchè in complesso venivano inoculate 3000-4500 U. I. per ciascuna nutrice.

La presa del latte venne fatta due volte: immediatamente avanti la 1ª iniezione e due giorni dopo la 3ª; i campioni presi asetticamente venivano messi in refrigerante, ove si lasciavano per 24 ore fino alla quasi completa separazione del grasso. Il siero così ottenuto veniva poscia mescolato in diverse proporzioni alla tossina e la miscela era inoculata direttamente, non appena fatta, nella regione toracica sinistra degli animali in esperimento. L'animale scelto fu la cavia perchè, fra i piccoli animali di

laboratorio, il più sensibile alla tossina difterica, preferendo cavie di un peso medio di gr. 250 e variabili dai 230 ai 270 gr.

Volendo determinare approssimativamente la quantità di antitossina eliminata per la glandola mammaria, mi servii per ogni caso di dosi crescenti di siero di latte (0.10-4 cmc.), che dovevano agire sopra una quantità fissa di tossina. Il volume della miscela era sempre riportato a 5 cmc., mediante aggiunta di brodo di cultura.

Per la quantità di tossina adoperata le esperienze di ogni gruppo vennero divise in due categorie: nella prima adoperai dosi superiori alla minima letale (1-10 D. M. L.), nella seconda dosi inferiori ($^{8}/_{10}$-$^{1}/_{10}$ di D. M. L.). Nei casi di quest'ultima categoria, seguendo il metodo dell'Ehrlich adottato dal Salge (17) e modificato ultimamente dal La Torre (19), mi limitai, senza sacrificare l'animale, ad osservare i sintomi di reazione locale (edema, alopecia, necrosi). In tutte le cavie, che sopravvissero, tenni conto dei sintomi postumi (dimagramento, cachessia, paralisi postdifteriche). La tossina adoperata fu quella fornitami gentilmente dall'Istituto sieroterapico milanese diretto dal prof. Belfanti. La D. M. L., da me accertata prima delle esperienze, fu di cmc. 0.005 per cavie del peso di gr. 250.

Per comodità di spazio in tutte le tabelle, seguendo il sistema del Salge (17), col segno + va significata la presenza dei sintomi di reazione locale e con il segno — l'assenza dei medesimi.

TABELLA I (Serie *A*).

Nutrice O... T... di anni 32 al 6° mese di allattamento inoculata con 4500 U. I.

Il siero di latte si fa agire sopra cmc. 0.005 di T. = 1 D. M. L.

	PRIMA DELL'IMMUNIZZAZIONE				DOPO L'IMMUNIZZAZIONE		
	Inoculazione di				Inoculazione di		
	tossina — cmc.	siero di latte — cmc.	Risultati		tossina — cmc.	siero di latte — cmc.	Risultati
Cavia n. 1	0.005 = 1 D. M. L.	0.10	Morte dopo 4 giorni	Cavia n. 1	0.005 = 1 D. M. L.	0.10	Morte dopo 4 giorni.
» » 2	» = »	0.25	» 4 »	» » 2	» = »	0.25	» 4 »
» » 3	» = »	0.50	» 3 »	» » 3	» = »	0.50	» 5 »
» » 4	» = »	1.00	» 5 »	» » 4	» = »	1.00	» 5 »
» » 5	» = »	2.00	» 4 »	» » 5	» = »	2.00	» 8 »
» » 6	» = »	4.00	» 4 »	» » 6	» = »	4.00	Sopravvive residuando necrosi, alopecia, paralisi postdifteriche.
» » 7	» = »	Controllo	» 3 »	» » 7	» = »	Controllo	Morte dopo 3 giorni.

TABELLA II (Serie *A*).

Nutrice A... N... di anni 32 al 7° mese di allattamento inoculata con 4500 U. I.

Il siero di latte si fa agire prima e dopo l'immunizzazione su cmc. 0.005 di T. = 1 D. M. L.

PRIMA DELL'IMMUNIZZAZIONE				DOPO L'IMMUNIZZAZIONE			
	Inoculazione di		Risultati		Inoculazione di		Risultati
	tossina — cmc.	siero di latte — cmc.			tossina — cmc.	siero di latte — cmc.	
Cavia n. 1	0.005 = 1 D. M. L.	0.10	Morte dopo 4 giorni	Cavia n. 1	0.005 = 1 D. M. L.	0.10	Morte dopo 4 giorni.
» » 2	» = »	0.25	» 5 »	» » 2	» = »	0.25	» 4 »
» » 3	» = »	0.50	» 4 »	» » 3	» = »	0.50	» 4 »
» » 4	» = »	1.00	» 4 »	» » 4	» = »	1.00	» 4 »
» » 5	» = »	2.00	» 5 »	» » 5	» = »	2.00	» 15 »
» » 6	» = »	4.00	» 5 »	» » 6	» = »	4.00	Sopravvive; si ha edema e necrosi.
» » 7	» = »	Controllo	» 4 »	» » 7	» = »	Controllo	Morte dopo 3 giorni.

TABELLA III (Serie *A*).

Nutrice G... N... di anni 36 al 9° mese di allattamento inoculata con 3000 U. I.

Il siero di latte si fa agire prima e dopo l'immunizzazione su cmc. 0.0005 di T. = $^{1}/_{10}$ di D. M. L.

PRIMA DELL'IMMUNIZZAZIONE				DOPO L'IMMUNIZZAZIONE			
	Inoculazione di		Risultati		Inoculazione di		Risultati
	tossina — cmc.	siero di latte — cmc.			tossina — cmc.	siero di latte — cmc.	
Cavia n. 1	0.0005 = $^{1}/_{10}$ di D. M. L.	0.10	+ par. postdift.	Cavia n. 1	0.0005 = $^{1}/_{10}$ di D. M. L.	0.10	+
» » 2	» = » »	0.25	+	» » 2	» = » »	0.25	+
» » 3	» = » »	0.50	+	» » 3	» = » »	0.50	—
» » 4	» = » »	1.00	+	» » 4	» = » »	1.00	— par. postdift.
» » 5	» = » »	2.00	+ par. postdift.	» » 5	» = » »	2.00	— » »
» » 6	» = » »	4.00	+	» » 6	» = » »	4.00	—
» » 7	» = » »	Controllo	+	» » 7	» = » »	Controllo	+

I casi I e II, nei quali fu iniettata la D. M. L. e il caso III in cui fu potuto adoperare il metodo dell'Ehrlich, oltre che l'eliminazione delle antitossine, dimostrano approssimativamente la quantità che ne fu eliminata.

Così nel caso I, calcolando l'eliminazione normale di latte al 6° mese in cmc. 840 *pro die* (20), tenendo conto che in 4 cmc. vi era la quantità di antitossina necessaria per neutralizzare 1 D. M. L., vale a dire $^1/_{100}$ di U. I., si avrebbe una eliminazione giornaliera di 2.1 U. I.

Con lo stesso calcolo nel caso II l'eliminazione giornaliera sarebbe di U. I. 4.5 e nel caso III di 2.5.

Le altre 5 nutrici furono trattate alla stessa maniera delle 3 sopra esposte: il potere antitossico del siero di latte fu però saggiato in questi casi sopra quantità di tossina superiori alla D. M. L.

I risultati furono identici, sebbene meno evidenti: *in tutti i casi fu costante la presenza dell'antitossina difterica nel latte.*

L'eliminazione degli anticorpi specifici per la glandola mammaria sembra oramai certa tanto nell'uomo, quanto negli animali [Brieger ed Ehrlich (3), Ehrlich e Wassermann (1), Ketscher (2)], non ostante vi sia stato chi abbia voluto metterla in dubbio [Lustig e Galeotti (31), Kraus (22), Bertino (23)]. Essa sembra costante tanto nella immunità attiva quanto nella passiva, solo che nella prima sarebbe più notevole e duratura [De Blasi (2)].

Serie *B*.

Assorbimento dell'antitossina per l'intestino dei lattanti e sua ricerca nel sangue degli stessi.

Accertatomi così del passaggio dell'antitossina difterica nel latte, rivolsi le mie ricerche a determinare se essa venisse assorbita dall'intestino dei lattanti di differenti età e in quali proporzioni.

I bambini assoggettati all'esperimento furono 4, tutti allattati da 4 delle nutrici dell'esperienza precedente e di età di 10, 7, 2, 8 mesi. Essi avevano le funzioni gastro-intestinali normali e si trovavano in condizioni di sviluppo e di nutrizione molto floride.

Il sangue ottenuto dal polpastrello del dito mediante incisione con lancetta da salasso, veniva prelevato due volte: prima della inoculazione fatta alla nutrice e due giorni dopo l'ultima iniezione. Esso veniva raccolto asetticamente in tubi capillari. Il siero di sangue ottenuto mediante la centrifugazione veniva mescolato con la tossina. Il miscuglio si inoculava alle cavie nel modo anzidetto.

Data la scarsa eliminazione di antitossina per la glandola mammaria, ne conseguiva che, anche avvenendo il passaggio di essa attraverso l'intestino, nel sangue del poppante non se ne dovessero trovare che quantità ancora più scarse. Adottai perciò esclusivamente il metodo dell'Ehrlich: mi servii cioè di dosi non mortali di T. dift. ($^1/_{10}$ di D. M. L.) miste a siero di sangue. Dai sintomi di reazione locale (edema) calcolai se la tossina era stata completamente o incompletamente neutralizzata. Modificai perciò il metodo dell'Ehrlich in due punti: per comodità di tecnica, invece di iniettare tossina e siero di sangue in due punti differenti, preferii, come sopra ho esposto, farne la mescolanza previa diluizione con soluzione fisiologica di Na Cl al 0.75 %; la miscela, riportata in ogni caso al volume di 5 cmc., veniva iniettata nel sottocutaneo della regione toracica sinistra. Oltre a ciò, invece di sacrificare le cavie qualche tempo dopo tale inoculazione, allo scopo di vedere l'edema locale, preferii accertarmene con la semplice palpazione e tenere in vita gli animali, per notare anche gli effetti postumi della tossina (necrosi, alopecia, cachessia, paralisi postdifteriche, ecc.)

Espongo in tabella i risultati delle esperienze:

TABELLA IV (Serie *B*, osservazione 1ª).

Bambina di 10 mesi succhia il latte di nutrice R... C... inoculata con 4500 U. I.

Il siero di sangue del poppante si fa agire prima e dopo l'immunizzazione della madre su cmc. 0.0005 di T = 1/10 di D. M. L.

	PRIMA DELL'IMMUNIZZAZIONE				DOPO L'IMMUNIZZAZIONE		
	Inoculazione di		Risultati		Inoculazione di		Risultati
	tossina — cmc.	siero di sangue — cmc.			tossina — cmc.	siero di sangue — cmc.	
Cavia n. 1	0.0005 = 1/10 di D. M. L.	1/25	—	Cavia n. 1	0.0005 = 1/10 di D. M. L.	1/25	—
» » 2	» = » »	1/50	+	» » 2	» = » »	1/50	— par. postdift.
» » 3	» = » »	1/100	+ par. postdift.	» » 3	» = » »	1/100	— » »
» » 4	» = » »	1/200	+ » »	» » 4	» = » »	1/200	+ » »
» » 5	» = » »	1/300	+	» » 5	» = » »	1/300	+
» » 6	» = » »	Controllo	+	» » 6	» = » »	Controllo	+

Negli altri 3 bambini l'esperienza fu condotta alla stessa maniera e con gli stessi risultati. Ne risulta che *l'assorbimento di anticorpi da parte della mucosa intestinale è costante nei poppanti nutriti al seno di madri immunizzate passivamente.*

Qualche considerazione, ora, per determinare il grado di detto assorbimento:

OSSERVAZIONE I. — (Tab. IV):

L'età del bambino era di 10 mesi: il suo peso si può adunque calcolare in gr. 8880 (20) e la quantità totale del siero di sangue da esso posseduto cmc. 341 (17). Se pensiamo, ora, che il siero di sangue era già capace di annullare alla dose di $^1/_{25}$ di cmc., $^1/_4$ di D.M.L., osservando che dopo l'immunizzazione della nutrice $^1/_{100}$ di cmc. di siero era capace di annullare la stessa dose di tossina, è chiaro che il valore del siero era quadruplicato. Se quindi prima dell'immunizzazione, tutta la massa del sangue era già capace di annullare 852 D.M.L., dopo l'immunizzazione della nutrice esso riusciva a neutralizzarne 3310; in altre parole, se prima la massa totale del siero di sangue equivaleva ad 8 cmc. di Siero Normale, dopo ne equivaleva a 32 con un guadagno di cmc. 25 di S.N.

Applicando gli stessi criteri alle altre osservazioni, abbiamo;

OSSERVAZIONE II. —

Bambino di 7 mesi - Peso kg. 8.

Quantità totale di siero di sangue cmc. 307.

Potere antitossico del siero di sangue = cmc. 7.67 di S.N.

Id. del siero di sangue dopo l'immunizzazione = centimetri cubi 15.3 di S.N.

Guadagno cmc. 7.68 di S.N.

OSSERVAZIONE III.—

Bambino di 2 mesi - Peso kg. 5.

Quantità totale di siero di sangue cmc. 196.

Potere antitossico del siero di sangue = cmc. di 9.8 S.N.

Id. del siero di sangue dopo l'immunizzazione = centimetri cubi 16.6 di S.N.

Guadagno cmc. 6.8 di S.N.

OSSERVAZIONE IV. —

Bambino di 8 mesi - Peso kg. 8,600.

Quantità totale del siero di sangue cmc. 331.

Potere antitossico del siero di sangue = cmc. 8,27 di S. N.

Id. del siero di sangue dopo l'immunizzazione = centimetri cubi 33,1 di S. N.

Guadagno cmc. 24,83 di S. N.

Un fatto molto importante risultò da queste osservazioni e cioè che *l'età del poppante non influì sull'assorbimento.* Furono infatti i bambini maggiori di età quelli che maggiormente assorbirono anti-

tossina. Così che, almeno per la donna, non risulterebbe provata l'asserzione del Disse (15) nè le conclusioni del Bertarelli, il quale nella sua pregevole memoria (18), riportando i risultati ottenuti su cagne immunizzate attivamente per il tifo e alle quali fece attaccare dei neonati di varie età, venne alle stesse conclusioni del Disse: il passaggio cioè degli anticorpi avverrebbe più facilmente nei primi giorni di vita perchè a quell'epoca la mucosa intestinale è più permeabile che nei tempi successivi. Le esperienze della serie B dimostrerebbero invece che l'assorbimento degli anticorpi si fa egualmente nei diversi periodi di allattamento, e che anzi esso è maggiore nei bambini più grandicelli per maggior quantità di latte ingerito.

Serie *C*.

Assorbimento degli anticorpi specifici da parte della mucosa intestinale nelle cavie adulte.

Scopo di questa serie di ricerche fu quello di vedere se, eliminando ogni causa di errore, l'intestino delle cavie adulte fosse o no permeabile ai sieri contenenti anticorpi specifici.

In primo luogo feci agire la tossina difterica direttamente sull'animale che aveva inghiottito l'antitossina, sembrandomi questa la tecnica più rapida e più sicura.

Per evitare poi l'obbiezione che l'assorbimento potesse essere determinato dall'immissione di strumenti (sonde, ecc.) e consecutive lesioni dell'epitelio, usai per l'introduzione del siero un mezzo semplicissimo. Immobilizzato l'animale in posizione supina e divaricate le mascelle con una comune pinza da dissezione, facevo gocciolare nella bocca il siero antidifterico che l'animale finiva per inghiottire con gran facilità. Dopo 24 ore da tale ingestione inoculavo nel sottocutaneo del torace la tossina. Ammesso che l'antitossina venisse assorbita dall'intestino delle cavie, volli anche determinare la durata della persistenza della stessa nell'organismo. Inoculai perciò la tossina difterica a diversi giorni di distanza dalla introduzione dell'antitossina.

Era anche di grande importanza determinare se l'essere l'animale a stomaco vuoto (a digiuno da 24 ore) o a stomaco pieno, avesse influenza sull'assorbimento e sul grado di esso, ed inoltre se il veicolo con il quale era somministrata, potesse anch'esso esercitare una certa influenza. A tale scopo il siero antidifterico venne diluito con soluzione fisiologica, latte di vacca, latte di donna e brodo di cultura. In ogni caso le miscele erano riportate al volume di cmc. 5.

I risultati sono esposti nelle tabelle V-IX.

TABELLA V (Serie C, N. 1).

Assorbimento dell'antitossina difterica diluita in soluzione di Na Cl a 0,75 %.

	Peso gm.	Antitossina ingerita	Tossina iniettata cmc	Risultati al 15° giorno Peso gm.	Stato delle cavie
Cavia N. 1.	270	U. I. 10	0.010 = 2 D. M. L.	280	Alopecia totale dell'addome.
» » 2.	200	» 20	0.020 = 4 »	210	» » »
» » 3.	235	» 50	0.050 = 10 »	220	» » »
» » 4.	240	» 100	0.050 = 10 »	240	Alopecia lieve.
» » 5.	180	» 200	0.050 = 10 »	240	Mancanza completa di alopecia.
» » 6.	270	» 400	0.100 = 20 »	290	» » »
» » 7.	245	Controllo	0.005 = 1 »	..	Morte dopo 4 giorni.

TABELLA VI (Serie C, N. 2).

Assorbimento dell'antitossina diluita in latte di vacca.

La diluizione viene fatta in 5 cmc. di latte.

	Peso gr.	Antitossina ingerita	Tossina iniettata cmc.	Risultati
Cavia N. 1.	312	U.I. 5	0.025 = 5 D.M.L.	Morte al 4° giorno.
» » 2.	262	» 5	0.010 = 2 »	» » 5° »
» » 3.	318	» 5	0.005 = 1 »	Dopo 15 giorni. Peso gr. 250. Lieve alopecia
» » 4.	262	» 10	0.025 = 5 »	» » » 280 » »
» » 5.	300	» 10	0.010 = 2 »	Morte in 8 giorni
» » 6.	330	» 10	0.005 = 1 »	» » 4 »
» » 7.	328	Controllo	0.005 = 1 »	» » 3 »
» » 8.	332	»	0.010 = 2 »	» » 2 »

TABELLA VII (Serie *C*, N. 3).

Assorbimento comparativo dell'antitossina diluita con diversi veicoli.

	Peso gm.	Antitossina ingerita	Veicolo dell'antitossina	Tossina iniettata cmc.	Risultati dopo 15 giorni: Peso gm.	Risultati dopo 15 giorni: Stato delle cavie
Cavia N. 1.	258	U. I. 5	Latte di vacca cmc. 5	0.005 = 1 D.M.L.	260	Assenza completa di alopecia.
» » 2.	245	» »	» » »	» »	272	»
» » 3	260	» »	Latte di donna » »	» »	246	»
» » 4.	272	» »	» » »	» »	275	»
» » 5.	220	» »	Sol. Na Cl. 0.75 % » »	» »	234	»
» » 6.	280	» »	» » »	» »	268	»
» » 7.	254	» »	Brodo di cultura » »	» »	282	Lieve alopecia.
» » 8.	216	» »	» » »	» »	233	Assenza completa di alopecia.
» » 9.	260	Controllo	....	» »	..	Morte in 4 giorni.

TABELLA VIII (Serie *C*, N. 4).

Assorbimento dell'antitossina nelle cavie a stomaco vuoto.

Il siero antidifterico viene diluito in 5 cmc. di soluzione di NaCl a 0.75 %.

	Peso gr.	Antitossina ingerita	Tossina iniettata cmc	Risultati al 15° giorno
Cavia N. 1.	280	U.I. 5	0.005 = 1 D.M.L.	Peso gr. 280. Lieve alopecia.
» » 2.	254	» 10	0.010 = 2 »	» » 242. » »
» » 3.	260	» 10	0.015 = 3 »	Morte al 7° giorno.
» » 4.	290	» 5	0.005 = 1 »	Peso gr. 284. Lieve alopecia
» » 5.	220	» 10	0.010 = 2 »	» » 250. » »
» » 6.	233	» 10	0.015 = 3 »	Morte al 6° giorno.
» » 7.	258	Controllo	0.005 = 1 »	» » 3° »

Tabella IX (Serie *C*, N. 5).

Permanenza degli anticorpi nell'organismo che li ha ingeriti.

La tossina difterica viene iniettata a distanza varia dall'ingestione dell'antitossina.

	Peso gr.	Antitossina ingerita	Tossina iniettata cmc.	Risultati
Cavia N. 1	280	U.I. 5	0.005 = 1 D.M.L.	Dopo giorni 2 dall'ingestiono di siero. L'animale non sopporta alcuna molestia.
» » 2	272	» »	» »	Dopo giorni 5 dall' ingestione di siero. L'animale non sopporta alcuna molestia.
» » 3	260	» »	» »	Dopo giorni 10 dall'ingestione del siero. Alopecia.
» » 4	245	» »	» »	Dopo giorni 20 dall' ingestione di siero. Alopecia.
» » 5	270	» »	» »	Dopo giorni 30 dall' ingestione di siero. Alopecia.
» » 6	295	» »	» »	Dopo giorni 35 dall' ingestione di siero. Alopecia.
» » 7	284	» »	» »	Dopo giorni 40 dall' ingestione di siero. Alopecia.
» » 8	278	» »	» »	Dopo giorni 45 dall' ingestione di siero. Morte in 12 giorni.
» » 9	290	» »	» »	Dopo giorni 45 dall' ingestione di siero. Morte in 10 giorni.
» » 10	263	» »	» »	Dopo giorni 50 dall' ingestione di siero. Morte in 10 giorni.
» » 11	271	» »	» »	Dopo giorni 50 dall' ingestione di siero. Morte in 8 giorni.
» » 12	252	» »	» »	Dopo giorni 55 dall' ingestione di siero. Morte in 8 giorni.
» » 13	288	» »	» »	Dopo giorni 60 dall' ingestione di siero. Morte in 5 giorni.
» » 14	280	Controllo	» »	Dopo giorni 1 dall' ingestione di siero. Morte in 4 giorni.

Tutti e 5 i gruppi della serie *C* (tab. V-IX) provano in maniera abbastanza evidente che *l'assorbimento degli anticorpi per l'intestino delle cavie adulte è sicuro: però tale assorbimento è soltanto parziale poichè avviene in minime proporzioni*. Difatti dalla tab. V risulta che, somministrando 5 U. I. la quantità cioè di A. sufficiente per neutralizzare 500 D. M. L. di T. non si riesce a neutralizzarne che una;

l'assorbimento non avverrebbe quindi che nelle proporzioni di $^1/_{500}$. Ciò è confermato dalle tab. VI-VII.

Risulta inoltre che sull'assorbimento degli anticorpi poca influenza esercita il veicolo nel quale sono diluiti (latte di donna, di vacca, soluzione di Na Cl, brodo sterile) (tab. V-VII).

Oltre a ciò *l'intensità dell'assorbimento in un periodo di tempo abbastanza lungo è la stessa a stomaco pieno e a stomaco vuoto* (tab. VIII).

In quanto poi alla persistenza in circolo degli anticorpi, dobbiamo ritenere che essi perdurano per un certo tempo (tab. IX). Fino al 10° giorno la ritenzione è massima, tanto che le cavie cui si son fatte ingerire 5 U. I. tollerano benissimo 1 D. M. L. senza alcun segno di reazione locale (cavie 1-2).

Dal 10° al 40° giorno le cavie perdono del potere immunizzante, tanto da non neutralizzare più completamente la D. M. L., come è provato dalla comparsa dei segni di reazione locale (cavie 3-7). Dopo il 45° giorno si ha la morte degli animali, sebbene con notevole ritardo rispetto ai controlli. Al 50° giorno è scomparsa ogni traccia di antitossina e la morte si verifica nello stesso tempo dei controlli.

SERIE *D*.

Assorbimento di anticorpi per l'intestino di bambini della 2ª infanzia.

Essendomi dalle precedenti esperienze accertato che l'assorbimento di anticorpi legati a sieri omologhi avviene nei bambini, per lo meno fino all'età di 10 mesi (Serie *B*), e che l'intestino di cavie adulte lo assorbe, anche se legati a sieri eterologhi (Serie *C*), volli provare se nei bambini della seconda infanzia tale assorbimento si verificasse anche per gli anticorpi somministrati con sieri eterologhi.

Scelsi per tali prove 2 bambini dell'infermeria « Soccorso e lavoro », i quali non presentassero disturbi gastro-enterici nè lesioni della mucosa orale.

L'antitossina fu somministrata mista col latte durante uno dei pasti principali a dosi di 2000 U. I. al giorno e per la durata di 3 giorni nel primo bambino, alla dose di 4500 U. I. in una sola volta nel secondo. Il potere antitossico acquistato dal sangue fu provato sulle cavie col metodo esposto nella serie *B* e in ambedue l'andamento dell'esperienza fu identico a quello indicato dalla tab. IV.

CASO I. — C.... R.... di anni 3 ½, malarico.

Entra all'infermeria il 21 luglio 1905; il 24 diviene apirettico. Nei giorni 29, 31 luglio e il 2 agosto si somministrano con latte di vacca 2000 U. I. *pro die* di siero antidifterico Behring.

Il potere antitossico del siero di sangue, provato prima (29 luglio) e dopo l'ingestione del siero (4 agosto), dette i seguenti risultati:

Prima dell'ingestione del siero per neutralizzare 1/10 di D. M. L. occorreva 1/25 di cmc. di siero; dopo l'ingestione la stessa quantità di T. era neutralizzata soltanto da 1/100 di cmc. Il valore antitossico del siero era quindi quadruplicato.

Caso II. — A.... M.... di anni 7 ricoverato all'infermeria per essere operato di ginocchio valgo rachitico, inghiottisce con latte di vacca 4500 U. I. di siero Behring.

La prova del potere antitossico del siero di sangue prima dell'ingestione (15 novembre) dimostra che per neutralizzare 1/10 di D. M. L. occorre 1/25 di cmc. di siero; dopo l'ingestione (17 novembre) ne bastava soltanto 1/100 di cmc. Anche in questo caso quindi il valore antitossico del siero di sangue era quadruplicato.

Anche i risultati di questa serie confermano quelli ottenuti precedentemente e cioè che *l'intestino dei bambini della seconda infanzia è anch'esso capace di assorbire e di trattenere nell'organismo una parte di quegli anticorpi che si fanno ingerire anche legati a sieri eterologhi.*

***

Come spiegare ora la disparità dei risultati ottenuti dai diversi sperimentatori che si sono occupati dell'argomento? Ho già accennato che buona parte di queste divergenze è dovuta alle diverse condizioni di esperimento in cui ogni sperimentatore si è posto, alle diverse specie di immunità che si son volute conferire, e specialmente alle modalità della tecnica adoperata. Bisogna difatti tener conto che qualunque sostanza introdotta nell'organismo subisce una diluizione molto forte nei liquidi organici e che per conseguenza occorre una tecnica molto fine, capace di svelarne anche minime tracce. Ma tutto ciò non basta a spiegare la contraddizione di molte teorie fra di loro, contraddizioni però a dire il vero più apparenti che reali.

Tutte le teorie infatti di cui ho fatto cenno precedentemente esprimono una verità e tutte possono andare d'accordo se però intese in senso relativo. Così intesa, l'opinione di Brieger ed Ehrlich (5), e quella di Salge (17) è scientificamente incontestabile poichè esprime uno dei concetti fondamentali della fisiopatologia infantile: *l'assorbimento del latte di una specie animale differente è più difficile di quello di un latte della stessa specie e l'assorbimento del latte materno è il più perfetto e il più completo.* Concetto questo provato dalla superiorità dell'allattamento materno su quello di nutrice e specialmente su quello artificiale. Oltre a ciò, inteso in senso relativo il concetto di Brieger

ed Ehrlich e di Salge può accordarsi con le vedute degli altri AA., mentre sarebbe difficilmente spiegabile se inteso in senso assoluto.

Alla stessa maniera vanno interpretate le conclusioni del Disse, Behring, Römer, Bertarelli, Escherich, Uffenheimer.

E' infatti probabile che nei primi giorni di vita l'assorbimento sia facilitato dall'incompleta formazione dell'epitelio intestinale; ma questo fatto non esclude l'assorbimento nelle età successive.

Oltre a ciò è fuor di dubbio che nel conferimento dell'immunità dalla nutrice al poppante il genere d'immunità da conferire abbia una parte non indifferente: difatti le esperienze di De Blasi dimostrano che nell'immunità attiva i risultati sono più evidenti e duraturi che non nella passiva.

Dall'insieme delle mie ricerche non mi sento autorizzato altro che ad affermare che da parte delle cavie adulte e dei bambini della prima e della seconda infanzia ha luogo l'assorbimento delle antitossine difteriche, tanto se legate a sieri omologhi quanto se legate a sieri eterologhi.

La permeabilità dell'intestino per gli anticorpi specifici è però argomento ancora inesplorato e ricerche decisive per risolvere tale questione non sono ancora state fatte.

Dall'esame però della numerosa letteratura sulla questione, dai dati fornitimi da questa serie di esperienze, mi sono convinto che l'assorbimento degli anticorpi in genere, contrariamente al parere di chi lo vuole ristretto ad alcune categorie di anticorpi o di chi lo vuole ristretto ad alcune determinate età o al veicolo in cui vengono somministrati (sieri omloghi ed eterologhi) debba seguire le leggi della fisiologia.

Ad ogni modo le conclusioni che da queste mie ricerche posso trarre sono le seguenti:

1° Nelle donne immunizzate passivamente con siero antidifterico l'eliminazione delle antitossine per la glandola mammaria è costante, ma avviene in quantità molte piccole.

2° Nei poppanti l'assorbimento degli anticorpi eliminati con il latte materno è costante.

3° L'età del poppante non ha un'influenza notevole sulla quantità di anticorpi assorbiti perchè, se è probabile che l'assorbimento sia più intenso nei primi giorni di vita, il guadagno di anticorpi è più sensibile nei tempi successivi essendo maggiore la quantità di latte ingerito.

4° Nelle cavie adulte l'assorbimento degli anticorpi avviene, anche se essi siano legati a sieri eterologhi. Però le quantità assor-

bite sono molto piccole ($^1/_{500}$ della dose ingerita). Poca o nessuna influenza vi esercita lo stato di ripienezza o meno dello stomaco, come pure i diversi veicoli nei quali il siero contenente anticorpi venga diluito.

5° Gli anticorpi assorbiti per il tubo gastro-enterico si possono dimostrare nelle cavie fino al 50° giorno.

6° Nei bambini della prima e della seconda infanzia l'assorbimento degli anticorpi avviene con le stesse modalità osservate nelle cavie.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ehrlich und Wassermann. *Ueber die Gewinnung der Diphterie-Antitoxine aus Blutserum und Milch immunisirter Thiere.* Zeitsch. f. Hyg. 1890. Bd. XVIII, pag. 239.
2. De Blasi. *Sul passaggio degli anticorpi nel latte e loro riassorbimento per l'intestino dei lattanti.* Rivista di Clin. Ped., anno III, 1904, n. 1.
3. Vaillard. *Sur l'hérédité de l'immunité acquise.* Ann. de l'Inst. Pasteur, 1896.
4. Minicis. *Efficacia della terapia antidifterica per via gastrica.* Gazzetta degli Ospedali, vol. 16°, 1896, n. 86, pag. 267.
5. Brieger und Ehrlich. *Beiträge zur Kenntniss der Milch immunisirter Thiere.* Zeitsch. f. Hyg. 1893. Bd. XIII, pag. 330.
6. Carrière. *Toxines et antitoxines dans le tube digestif.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1899, pag. 435.
7. Escherich. *Versuche zur Immunisierung gegen Diphterie auf dem Wege des Verdauungstrakten.* Wiener Klin. Wochenschr., 1897, n. 36.
8. Wakulenko A. *Ueber die Aenderung der spezif. Eigenschaften des Blutes der Thiere bei Fütterung mit getöteten Mikrobenkulturen.* Centr. f. Bakter., 1904, pag 555.
9. Maragliano E. *Der Kampf und die Immunisation d. Organismus gegen die Tuberkulose.* Vortrag auf dem Intern. Congr. in Madrid. Rip. in Baumgarten's Jahresbericht, 1903, pag. 422.
10. Mercatelli V. *Sulla vaccinazione antipestosa per via gastrica.* Riforma Medica, anno 1902, vol. 3°, pag. 362.
11. Behring E. *Tuberkulosebekämpfung.* Berl. Klin. Woch., 1903, n. 11, e 1904, n. 4.
12. Id. *Vortrag auf der 75. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Kassel.*
13. Id. *Phthisiogenese und Tuberkulosebekämpfung.* Deutsche Med. Woch., 1904, n. 6.
14. Id. *Tuberkuloseentstehung, Tuberkulosebekämpfung und Säuglingsernährung.* Beiträge zur experimentellen Therapie, 1904, H. 8.
15. Disse. *Untersuchungen über die Durchgängigkeit der jügentlichen Magendarmwand durch Tuberkelbazillen.* Berl. Klin. Woch., 1903, p. 4.
16. Römer. *Untersuchungen über die intrauterine und extrauterine Anti-*

toxinübertragung von der Mutter auf ihre Deszendenten. Berlin Klin. Woch., 1901, n. 46, p. 1150.

17, SALGE. *Ueber den Durchtritt von Antitoxin durch die Darmwand des menschlichen Säuglings.* Jahrbuch f. Kinderheilk, Physische Erziehung, LX, 1904, p. 2.

18. BERTARELLI E. *Intorno alle immunizzazioni attive e passive per le vie digerenti dei neonati e dei lattanti.* Riv. d'Ig. e Sanità pubblica, anno XVI, 1905.

19. LA TORRE F. *Ulteriori ricerche sul passaggio degli anticorpi nel sangue dei poppanti e sulla possibilità di un' applicazione clinica.* Policlinico, Sez. Med., 1905.

20. CONCETTI L. *L'igiene del bambino.* Casa editr. « Dante Alighieri », Roma, 1903.

21. LUSTIG e GALEOTTI. *Sulla possibile trasmissione per eredità o per allattamento della immunità acquisita verso la peste bubbonica.* Rend. della R. Accademia dei Lincei, 1897.

22. KRAUS. *Ueber das Vorkommen der Immunhämagglutinine und Immunhämolisine in der Milch.* Wiener Klin. Woch., ag. 1901, pag. 737.

23. BERTINO A. *Sul passaggio delle lisine dalla madre al feto.* Arch. It. di Ginec. Anno VIII, vol. 1°, marzo 1905, n. 3.

24. FIGARI. *Sull'assorbimento dei mezzi difensivi contro la tubercolosi attraverso il tubo digerente.* Annali dell'Istituto Maragliano, n. 2, settembre 1904.

25. FIGARI. *Sul passaggio delle agglutinine ed antitossine tubercolari nel latte e loro assorbimento per via del tubo gastro-enterico.* Ann. dell'Ist. Mar., n. 2, sett. 1904.

26. UFFENHEIMER. *Experimentelle Studien über die Durchgängigkeit der Wandungen des Magendarmkanales neugeborener Tiere für Bakterien und genuine Eiweisstoffe.* Archiv für Hygiene, 1906, pag. 1.

Studî sulla peste

pel prof. dott. **CAMILLO TERNI**, docente d'igiene in Milano.

PARTE II (*).

Cura razionale della peste.

Sieroterapia o intervento chirurgico immediato?

Per quanto le interessanti ricerche fatte in India dalle diverse Commissioni scientifiche, abbiano perfettamente risoluto il problema della etiologia e patologia della peste, completando i primi studi di Kitasato (1) e Yersin (2), ben pochi vantaggi vennero finora conseguiti nella cura perchè fummo indotti a considerare la peste esclusivamente come una infezione setticemica a decorso così rapido da doversi confondere le manifestazioni locali con quelle generali. Tutto il trattamento specifico fu quindi basato esclusivamente sulla sieroterapia, insistendovisi con erronei apprezzamenti anche quando risultava troppo evidente l'insuccesso della cura.

Il desiderio lodevole di poter conseguire anche per la peste i successi che la sieroterapia ha dato finora soltanto per la difterite, non deve illuderci al punto da escludere altri mezzi di cura che nella grande maggioranza dei casi possono arrecare la guarigione o coadiuvare efficacemente l'azione del siero, tanto più quando questa risulta debole o insufficiente.

Perciò dopo questi anni di prova in cui il siero antipestoso ebbe larghissima e quasi esclusiva applicazione nella cura della peste, mi è parso utile di esporre alcune considerazioni quali risultano da obbiettive osservazioni mie, in numerosi casi clinici di peste trattati con diversi metodi di cura.

(*) La I parte, *Diagnosi clinica, microscopica e batteriologica della peste*, venne pubblicata nella Riforma medica, nn. 232, 233 e 234, anno XVII e nella Zeitsch. f. Hygiene, Bd. XLIV, 1903.

I.

Sieri antipestosi.

In un precedente studio (3) ho avuto occasione di rilevare che il bacillo pestoso nell'uomo non si comporta veramente come un bacterio setticemico paragonabile al carbonchio, e che la penetrazione e diffusione nell'organismo non avviene mai direttamente per le vie sanguigne. Tutti i fatti clinici e sperimentali confermano che la peste è in un primo tempo localizzata nel sistema linfatico, e specialmente nei gangli, dove il bacillo pestoso trova le condizioni più favorevoli di vita e di sviluppo, ingenerando nel così detto bubbone un processo di flogosi e di necrosi, e la formazione di sostanze estremamente tossiche, le quali assorbite danno luogo ai sintomi più gravi e caratteristici di questa infezione. La presenza dei bacilli nel sangue avviene sempre in un periodo molto tardivo, e costituisce un fatto secondario nell'andamento della malattia, mentre ordinariamente la morte sopravviene prima ancora del passaggio dei bacilli dalle vie linfatiche a quelle sanguigne, per effetto della grave intossicazione dei prodotti elaborati nel bubbone, i quali agiscono specialmente con una azione paralizzante della circolazione capillare. In molti casi, anche dopo avvenuta l'infezione del sangue, si può ancora conseguire la guarigione spontanea, quando meno gravi sono i sintomi della intossicazione generale, fatto constatato anche da Albrecht e Ghon ed altri (4). Nella peste quindi il maggiore pericolo per la vita dell'individuo è dipendente dalla quantità dei veleni elaborati dai bacilli nei focolai di predilezione del sistema linfatico o in determinati tessuti, come p. es. avviene nei casi di pneumonite pestosa primaria, in cui la morte improvvisa per paralisi vaso-motoria capillare e cardiaca è l'esito ordinario, mentre le lesioni locali non possono ancora giustificare la perdita dell'ammalato [Lutz (5), W. C. Kossack (6), L. F. Childe (7)].

In queste condizioni è naturale che per soddisfare alla cura specifica della peste il primo requisito del siero dovrà essere un potere antitossico notevole, e ciò tanto più nei casi gravi, quando la flogosi nel punto di localizzazione dei bacilli ha raggiunto la fase necrotica, per cui molto difficilmente può esercitarsi in luogo una attiva distruzione dei bacilli per l'azione fagocitaria stimolata dal siero, mentre continua nella massa del tessuto morto impenetrabile ai fagociti, la produzione delle tossine e l'assorbimento con pericolo gravissimo per la vita dell'ammalato.

Queste condizioni essenziali del processo patologico della peste, da me prima esposte, furono ampiamente confermate dalla Commissione inglese in India (8), la quale opportunamente rileva che nella peste ha luogo un *processo combinato di invasione e intossicazione bacterica*, e che perciò è evidente che due differenti qualità di sostanze terapeutiche devono possibilmente essere applicate nella cura. In primo luogo *sostanze antibacteriche* capaci di uccidere o ostacolare lo sviluppo dei bacteri; in secondo luogo sostanze *antitossiche* collo scopo di eliminare o alleviare i sintomi prodotti dai veleni bacterici, dai quali sopratutto viene compromessa la resistenza naturale dell'organimo alla infezione.

***

I sieri curativi antipestosi attualmente in uso, corrispondono alle condizioni fondamentali terapeutiche ora esposte? Certamente no. I primi tentativi di Yersin si possono ora considerare come troppo affrettate speranze di fronte agli insuccessi costantemente confermati in seguito. Nè valse il cambiare metodo di immunizzazione dell'animale, secondo quanto ebbero a proporre Calmette e Borrel e più tardi Roux (9) (colture intere o virulenti inoculate in quantità gradualmente progressive nei cavalli). Ciò specialmente perchè non si tenne presente il fatto principale che caratterizza l'infezione pestosa nell'uomo, e cioè il complesso dei sintomi di intossicazione che appariscono non appena il bacillo si è insediato nei gangli linfatici determinandovi la formazione del bubbone.

Tutti i tecnici che si occuparono di sieroterapia della peste devono ora essere persuasi che nessun animale ordinariamente disponibile per tale preparazione, *produce un siero antitossico nelle condizioni più desiderabili per la cura, e che nè meno si può raggiungere un alto potere antibacterico, tale da dare sicuri e costanti risultati, anche nel periodo iniziale della infezione, quando non sono ancora manifesti o quasi i sintomi della intossicazione.*

Col metodo proposto dal Lustig (10) sembrava teoricamente più facile di raggiungere l'intento, immunizzando l'animale con proteine in gran parte solubili e presumibilmente più assimilabili col trattamento chimico subito nella preparazione: ma pur troppo siamo innanzi ad una nuova delusione, poichè resta provato che i cavalli non distruggono se non in minimo grado la nucleo-proteide pestosa, e non producono efficaci sostanze curative nel loro siero. Da questo punto di vista è meglio quindi ancora di seguire il metodo di inoculare colture intere virulenti con che si ottiene una azione stimolante maggiore dei fagociti e la produzione di sostanze antibacteriche che, per quanto labili, sono però nel siero di data recente abbastanza attive, specialmente quando si utilizzano nella preparazione muli, asini e bovini in luogo dei cavalli. Adoperando i cavalli si incorre troppo spesso nel pericolo che il siero abbia un potere tossico anzichè curativo, per l'eccesso dei veleni bacterici non distrutti, e ancora attivi e presenti nel siero. Perciò in alcune osservazioni fatte in India è risultato che la mortalità era maggiore fra gli individui trattati col siero, per quanto la cura fosse incominciata nel primo giorno della malattia, in condizioni quindi più favorevoli per attenderne un risultato benefico.

La Commissione inglese, con molta opportunità, dopo anni di osservazioni ed esperienze ben dimostrative, venne alle seguenti conclusioni sulla questione dei sieri antipestosi:

« 1° Siamo d'opinione che la sieroterapia della peste non è stata coronata da successi terapeutici in alcun modo comparabili con quelli ottenuti nella difterite; in ogni modo la sieroterapia nella peste come in altre malattie infettive, si presenta come l'unico metodo che offre qualche promessa di successo definitivo;

« 2° Il trattamento col siero non ha dato sufficienti risultati per consigliarne l'estensione dell'uso nelle presenti condizioni, come mezzo generale in tutte le località colpite dalla peste. Sembra a noi che le imperfezioni degli attuali metodi di preparazione e applicazione *dovrebbero essere pienamente riconosciute*, e che il concetto direttivo nel progredire non deve essere nell'applicare i sieri attualmente disponibili nel maggior numero di ammalati, *ma nello studio delle modificazioni che intervengono nel sangue degli animali destinati alla preparazione del siero per la assimilazione delle tossine pestose, e la elaborazione delle sostanze antitossiche e antibacteriche. Nello stesso modo dovrebbero essere con cura studiate le condizioni del sangue dei pestosi e le modificazioni che intervengono nel medesimo in seguito alla somministrazione di siero* ».

Sono appunto questi i criteri cui si è indirizzato il Laboratorio sieroterapico di Messina, quando abbiamo dovuto occuparci della sieroterapia della peste.

La possibilità di preparare con altri metodi un siero antipestoso con elevato potere antitossico fu nostra costante preoccupazione, e in altro studio ho esposto le ricerche fatte e i risultati ottenuti indubbiamente superiori a quelli del siero preparato dal Yersin e dal Lustig e Galeotti, sia nella cura dell'uomo come negli esperimenti sugli animali. La diversità di metodo nella preparazione dei sieri coi processi di Yersin e Roux, e di Lustig-Galeotti non è tale da determinare grandi differenze nella qualità dei prodotti e negli effetti curativi, poichè il primo inocula nei cavalli o filtrati di colture o colture intere; e l'altro si serve delle proteine estratte dal corpo dei bacteri con metodo chimico. Nè coll'uno nè coll'altro metodo è possibile di ottenere un siero di notevole azione antitossica specialmente coi cavalli, e il risultato nella cura si risolve esclusivamente in uno stimolo dell'azione fagocitaria, non sempre decisamente manifesto nè meno colle inoculazioni endovenose: e solo si nota un lieve vantaggio per il siero preparato col metodo di Lustig-Galeotti, quale si può desumere dalle statistiche dell'Arthur Road Hospital, di Bombay, del resto non esenti da errori di metodo e di calcolo. Risultati simili nella cura della peste si possono conseguire anche coi sieri artificiali di Hajem, di Fodor e meglio ancora colle inoculazioni di sublimato corrosivo proposte dal Baccelli (11), per il grande potere stimolante esercitato dall'albuminato di mercurio sui leucociti, come risulta dagli studi del Gaglio (12), James Ross (13), Arnozan e Montel (14), Stassano (15), Baldoni (16) e altri.

Già dalle prove di controllo *in vitro* e negli animali (topi, ratti, cavie, conigli) si può facilmente rilevare la poca o nessuna efficacia curativa del siero antipestoso, preparato dai cavalli coi processi ordinarî di immunizzazione.

Le sostanze antibacteriche (agglutinine, bactericide, o bacteriolisine) vi si riscontrano in così debole grado da rendere costantemente incerto l'esperimento. Secondo Kolle (17) il siero antipestoso agisce solo come preventivo e non è puramente antitossico come avviene pei sieri del tetano e della difterite, nè puramente bactericida come quelli del colera e del tifo: la sua azione si esplicherebbe a preferenza per mezzo di bacteriolisine e *di altre sostanze i cui caratteri biologici coi nostri attuali metodi di ricerca non possono essere determinati.*

Sono appunto queste sostanze per ora ignote che conferiscono al siero antipestoso quel tanto di efficacia preventiva che si può in esso dimostrare, esperimentando con gran numero di animali. Esse agiscono soprattutto come uno stimolo dei fagociti, e non costituiscono un carattere specifico del siero, potendosi con altri mezzi ottenere risultati altrettanto sensibili.

Le bacteriolisine si dimostrano efficaci soltanto in presenza di bacilli pestosi già attenuati (Markl) (18), mentre la distruzione dei bacilli virulenti nell'organismo avviene quasi interamente, per effetto della fagocitosi.

Nella prova dei sieri negli animali ci troviamo di fronte a fatti che non offrono alcuna spiegazione, quando ci si allontana da questo principio, esattamente dedotto dalla osservazione libera da ogni preconcetto.

Quando anche si possono dimostrare nel siero antipestoso ambocettori capaci di grande affinità per gli elementi recettori dei bacteri; l'azione bactericida manca. Molti animali soccombono alla infezione pur avendo ricevuto dosi di siero superiori alla media dimostrata efficace: altri invece resistono anche con dosi minori, pur essendo rigorosamente rispettate tutte le altre condizioni dell'esperimento.

Come osserva Kolle, non si può in simili casi concludere che la morte degli animali che hanno ricevuto più alte dosi di siero, avvenga per una sovrabbondanza di ambocettori, secondo la teoria delle catene collaterali di Erlich per cui viene impedita la fissazione del corpo immunizzante, verificandosi cioè la così detta deviazione complementare di Neisser e Wechsberg: nè che possa dipendere dalla diversa virulenza dei bacilli. Kolle perciò ritiene che a determinare questo instabile comportamento del siero antipestoso nell'organismo animale, insieme con altri fattori sconosciuti, interviene la predisposizione individuale dei singoli animali per la infezione pestosa, che in molti casi non può essere vinta anche colle più alte dosi di siero.

Seguendo attentamente l'azione del siero antipestoso nell'organismo, inoculato successivamente in diversi intervalli di tempo con dosi minime di *virus*, si può benissimo constatare che negli animali destinati a soccombere, non si manifesta o quasi la fagocitosi nei punti di innesto e nelle vie linfatiche vicine, la quale risulta invece attivissima negli animali arrivati alla guarigione. Ma anche negli animali morti pur essendo inoculati col siero si verifica il fatto, già rilevato dal Kolle, che la morte non avviene coi caratteri di una vera setticemia come nei controlli: e raramente esistono bacilli nel circolo sanguigno: essi rimangono localizzati al punto d'innesto o nei gangli linfatici vicini, ma l'animale soccombe per intossicazione. Negli animali come nell'uomo, ciò che si può finora ottenere riguardo all'azione terapeutica del siero *è un prolungamento della malattia, non la guarigione.*

Tutti questi fatti che si accordano perfettamente negli animali da esperimento e nell'uomo ammalato, dimostrano che dal siero antipestoso preparato coi metodi ora in uso, il clinico può sperare soltanto una azione di stimolo della fagocitosi, resa più incerta nel senso che *per peculiari condizioni individuali, non tutti gli animali, anche della stessa specie, subiscono questo stimolo in modo uniforme e proporzionale alla quantità del siero inoculato.*

E ancora si deve notare che le sostanze proprie del siero deter-

minanti una chemiotaxi positiva contro i bacilli pestosi, sono molto labili, e che nel siero antipestoso esistono sempre residui di veleni bacterici non ancora neutralizzati e di carattere più fisso. Perciò quando viene a mancare comunque nell'organismo l'azione benefica stimolatrice dei leucociti, esso deve risentire maggiormente l'effetto dei prodotti tossici eventualmente presenti nel siero, i quali concorrono sicuramente a pregiudicare l'esito della malattia.

La diversità del comportamento che si rileva usando sieri freschi appena prelevati dall'animale immunizzato, e altri di graduale stagionatura, rende evidente che i primi contengono un massimo di sostanze stimolatrici e di batteriolisine, negli ultimi rimangono invece in attività quasi solo i residui delle tossine bacteriche, fino al punto da rendere il siero *nocivo*, perchè *affretta la morte degli animali.*

In seguito a tutti questi fatti comprovanti che l'azione dei sieri antipestosi ora in uso è quasi esclusivamente limitata allo stimolo della fagocitosi senza carattere specifico, mi sembrava ragionevole di provare negli animali e nell'uomo il comportamento di altre sostanze di attività chemiotattica positiva, e specialmente il sublimato corrosivo, sia nella formola proposta dal Baccelli, sia aggiunto nella proporzione di gr. 0.1 $^{\circ}/_{\circ\circ}$ al siero di animali immunizzati, allo scopo di ottenere, oltre di una maggiore e più costante azione stimolatrice dei fagociti, anche un ostacolo alla diffusione dei bacilli lungo le vie linfatiche e negli organi, dove a preferenza viene a fissarsi il mercurio (Stassano, Baldoni).

Dal risultato delle prove eseguite non v'ha dubbio che il mercurio deve essere considerato come un energico coadiuvante dell'azione del siero antipestoso, perchè è capace di attivare il processo fagocitario in un numero di casi notevolmente superiore a quanto si verifica negli animali trattati col solo siero, risultandone inoltre un maggiore prolungamento della vita e una diminuzione della mortalità per quanto lieve.

È però sempre evidente che un gran numero di animali soccombe per effetto della intossicazione pestosa, pur essendo dimostrabile un'attivissima azione dei fagociti, che appariscono nei punti di innesto e nei gangli linfatici, carichi di bacilli in disfacimento. Si direbbe che in simili casi difetta nell'organismo il potere distruttivo delle tossine bacteriche eliminate dai leucociti come *caput mortuum* della loro digestione, o che venga a mancare in questi la facoltà di assimilare e distruggere i veleni provenienti dalla disgregazione dei corpi bacterici, quale si manifesta invece negli animali che sopravvivono alla infezione.

In ogni modo anche da questa serie di esperienze veniva sempre più confermato il fatto che a determinare il quadro tipico della infezione pestosa concorrono due condizioni essenziali: la diffusione progressiva dei bacilli insediati prima nelle vie linfatiche, e la intossicazione per i prodotti dai medesimi elaborati nei punti di predilezione e pei residui tossici del loro disfacimento.

Contro questi fattori, finora la sieroterapia può opporre soltanto una minima parte di attività con uno stimolo non sempre costante della fagocitosi. Resta ora a vedersi se con altri metodi di preparazione

è possibile di ottenere nel siero un aumento delle proprietà bactericide o batteriolitiche, fino a dare qualche affidamento per la guarigione, o meglio di conseguire un siero *polivalente* con elevato potere antitossico, essendo nella maggior parte dei casi di peste nell'uomo più a temersi i sintomi e le conseguenze della intossicazione che non la setticemia — la quale avviene in un tempo più o meno tardivo, quando sono esauriti nell'organismo i poteri di difesa per l'azione delle tossine in circolo.

Partendo dalle osservazioni ora esposte, dopo numerose ricerche ed esperienze comparando specialmente l'azione tossica dei prodotti patogeni pestosi dell'uomo e degli animali in confronto con quelli delle colture artificiali, mi sono convinto della opportunità di immunizzare gli animali da siero coi prodotti derivati dall'organismo ammalato (essudato peritoneale di cavie pestose, succo di bubboni, ecc.) in luogo delle colture artificiali, in cui non può essere dimostrata una vera tossina pestosa attiva. E poichè i cavalli risultavano assai poco resistenti all'azione di simili prodotti, furono sostituiti i muli, gli asini e i bovini con risultati assai promettenti, poichè il valore antibatterico e antitossico del siero così ottenuto paragonato con quello del siero di cavallo immunizzato con colture (Roux-Jersin) o colla nucleo-proteide del Lustig, varia nel rapporto di 50 : 1.

In questo modo si poteva conseguire un antisiero *polivalente*, attivo specialmente contro le tossine, specifiche pestose presenti nei bubboni primari, e prodotte dalla attività dei bacilli sugli elementi propri del tessuto del ganglio linfatico, e forse in modo particolare dalla linfa, dalla necrosi consecutiva del parenchima e dei leucociti, e dal disfacimento dei bacteri. Certo in nessun altro modo è possibile di preparare un anti-siero capace di neutralizzare *in vitro* gli estratti filtrati del bubbone primario, e di impedire la morte degli animali per intossicazione, che avviene costantemente nei controlli.

Il siero preparato con questo metodo venne largamente usato in Brasile in confronto col siero Lustig, e con quello Yersin. I risultati però per quanto dimostrativi a favore del nuovo metodo, avendosi una mortalità totale degli ammalati trattati con questo siero ridotta a 25 %, lasciano sempre luogo a dubbi sia per la difficoltà di simili prove in numero relativamente ristretto di ammalati e in epidemie per intensità e casi clinici spesso troppo diverse; ma più perchè il siero prodotto col mio metodo in Brasile era sempre di recente preparazione, mentre le altre due qualità erano di data molto anteriore. Ora la grande instabilità delle sostanze antibacteriche e antitossiche del siero antipestoso comunque preparato — sostanze per la maggior parte non specifiche — rendono assai difficile di avere dati statistici comparabili, quando non si usino sieri preparati di fresco e in epidemie di eguale intensità. Le esperienze sugli animali, in cui il decorso della peste acquista un carattere più rapidamente setticemico, e in cui dovrebbero quindi a preferenza agire le sostanze antibacteriche del siero antipestoso, dimostrano che anche queste sostanze si eliminano rapidamente tanto che i risultati variano talvolta in modo impressionante con un medesimo campione di siero, quando venga usato prima fresco e poi a distanza anche solo di 4-5 giorni. Ciò venne pure constatato dalla Commissione Inglese col siero preparato dal Galeotti col metodo di Lustig e col siero Yersin (19).

A questo principale inconveniente devo aggiudicare il risultato incerto ottenuto in Bombay anche col mio siero che venne provato in una serie di 300 ammalati sotto il diretto controllo di J. Haffkine, cui rendo qui i migliori ringraziamenti. Si trattava di una partita

di siero il cui uso venne ritardato di oltre 6 mesi, e che non potè essere a tempo rimpiazzata con siero di data più recente (*).

È opportuno di rilevare dalla relazione di Haffkine (20) che il siero preparato col mio metodo ha dato migliori risultati nei casi gravi, mentre l'effetto riusciva meno evidente nei casi leggeri: infatti si verificava che negli ammalati con temperatura fra 39°-40° C., il siero si dimostrava molto più efficace che in quelli la cui temperatura oscillava fra 37°.5 — 38°.5 C. Questo fatto mentre a prima vista sembrerebbe una contraddizione è la migliore riprova dell' azione antitossica del siero preparato col nuovo metodo proposto, la quale benchè poco sensibile per invecchiamento del prodotto, era sempre ancora abbastanza evidente nei casi di *pestis major*, in cui la febbre elevata e la tachicardia sono indizio certo della intossicazione generale pei veleni specifici pestosi, e non in quelli in cui la febbre iniziale e leggiera può essere ancora considerata come la prima reazione dell'organismo alla invasione del virus, senza avere carattere specifico.

Il siero poi venne usato solo per via ipodermica e non endovenosa come era stato prescritto, e in dosi da 50-130 cm³, molto inferiori a quelle usate cogli altri sieri (300-500 cm³): inoltre le prove furono iniziate solo nel novembre 1902 con un siero preparato nel maggio, e si prolungarono fino al luglio 1903 col medesimo prodotto, che evidentemente aveva perduto quasi interamente la sua efficacia.

Il carattere della instabilità delle sostanze terapeutiche del siero antipestoso è un'altra conferma diretta della sua azione poco o punto specifica, la quale è facilmente rilevabile seguendo attentamente il suo effetto nell'uomo ammalato, come negli animali di esperimento.

Riporto una tavola comparativa delle osservazioni fatte in India coi diversi sieri, nelle più rigorose condizioni di esperimento, perchè in questa serie gli ammalati di controllo erano strettamente comparabili per forme cliniche coi casi trattati col siero. È inutile dire che in questi esperimenti furono rilevati i più minuziosi dettagli clinici nell'andamento della malattia, registrati in accurati appunti nel citato rapporto del Bannermann: essi hanno quindi un valore assoluto per giudicare l'azione specifica curativa dei sieri nell'uomo.

(*) Per cause indipendenti dalla mia volontà, che saranno quanto prima note per mezzo di una inchiesta, l' Istituto Sieroterapico di Messina fu messo nella impossibilità di corrispondere alle ulteriori richieste del Governo Inglese per continuare le prove in India col siero di nostra preparazione.

Siero usato	Casi trattati col siero						Controlli				Media dei giorni di maggiore durata della malattia nei casi trattati col siero
	Data e luogo della preparazione	Modo di inoculazione	Casi	Morti	Guariti	Mortalità %	Casi	Morti	Guariti	Mortalità %	
Roux-Jersin. . . .	Recente — Nha-trang (Tonkino) e Parigi (cavalli)	sottocutanea e endovenosa	226	168	58	74.33	231	163	68	70.56	3.38
Lustig.	Recente — Bombay (cavalli)	sottocutanea e endovenosa	608	436	172	71.71	609	482	127	79.14	1.13
Terni	6 mesi a 1 anno — Messina (muli e bovini)	sottocutanea	110	89	21	80.90	110	90	20	81.81	0.34
Brazil	6 mesi — S. Paulo (Brasile) col metodo Jersin (cavalli)	sottocutanea e endovenosa	70	58	12	82.85	70	60	10	85.71	0.31

Nelle prove fatte col siero di Messina e con quello Roux-Jersin dal dott. Godinho nei pestosi dell'ospedale di isolamento di Santos (Brasile), si ebbero i seguenti risultati:

Qualità dei sieri	Casi trattati	Guariti	Morti	Siero consumato in cmc.	Dose media di siero per ogni guarito	Dose media di siero per ogni morto	Mortalità %
Terni, Messina Siero *polivalente* (di 2 mesi)	8	5	3	720	71	125	37.5
Roux-Jersin, Parigi Antibacterico (di 2 mesi)	20	12	8	1875	116	60	40

Come si vede i due sieri corrispondono negli effetti, benchè con quello di Messina si usassero dosi di un terzo e più inferiori a quelle del siero Roux-Jersin, e fosse anche somministrato solo per via ipodermica.

Nella peste bubbonica ancora limitata ai gangli linfatici periferici, in fatto di sieroterapia vediamo riprodursi le stesse condizioni che si verificano nel tifo, altra malattia a carattere infettante e tossico prima localizzata nel sistema linfatico dell'intestino e del mesentere. E si comprende come anche nel tifo non si potrà mai sperare una cura efficace da un siero puramente antibacterico (Chantemesse), preparato con colture artificiali, nelle quali non si producono le tossine specifiche che caratterizzano il tipo clinico della malattia nell'uomo, formate dai bacilli solo dentro il parenchima dei gangli e nèi follicoli linfatici. Il metodo da me proposto e utilizzato nella preparazione di antisieri in simili malattie corrisponde alle più esatte nozioni sulla etiologia e natura di queste infezioni, e merita di essere raccomandato per ulteriori prove e ricerche a preferenza di tutti i metodi finora usati.

Dai risultati ottenuti nelle prove sull'uomo si possono trarre le seguenti conclusioni circa la efficacia curativa dei sieri antipestosi:

1° Il siero preparato dai cavalli con colture artificiali possiede per un mese circa un potere antibacterico, che nell'ammalato si esplica con uno stimolo della fagocitosi, così da conseguirne *un prolungamento della malattia, ma non la guarigione*, perchè l'azione antitossica manca.

2° Il siero *anti-proteidico* (metodo Lustig-Galeotti) possiede sostanze antibacteriche e antitossiche, ma in minimo grado e di durata effimera (circa una settimana).

3° Il siero *polivalente* preparato col mio metodo, per il valore, qualità e durata delle sostanze immunizzanti, rappresenta quanto di meglio si può ora sperare per la sieroterapia della peste.

Con ciò non intendo dire risoluta la questione della sieroterapia della peste, perchè nei casi più gravi ancora si manifesta la deficienza del potere curativo del siero per la debole e instabile azione antitossica. Cogli animali ordinariamente disponibili nei laboratori per la produzione in grande dei sieri non è possibile finora di ottenere un siero antipestoso che abbia una efficacia curativa antitossica anche lontanamente paragonabile a quella del siero antidifterico, e a questa deficienza si devono attribuire gli insuccessi della sieroterapia della peste, invano dissimulati con cifre statistiche di valore per solito molto discutibile, o colla gravità dei casi sottoposti alla cura. Soltanto dall'uomo convalescente di forme gravi di peste o dalle scimmie (*macacus*

resus) e dai ratti (*mus decumanus*) è possibile di ottenere un siero antitossico e antibacterico attivissimo, riducendosi a 20-30 cent. cubici di siero la dose normale di U. I. sufficienti alla cura, anche nei casi di gravissime complicazioni bronco-polmonari, che finora sono rimasti ribelli a qualunque altro siero antipestoso.

Ma la difficoltà di procurarsi simili sieri, rende praticamente inutile il risultato di queste osservazioni, sopratutto quando occorrono grandi quantità di materiale per far fronte alle esigenze di una epidemia.

Il problema della cura specifica della peste rimane perciò ancora in gran parte insoluto. I vantaggi attualmente conseguiti colla sieroterapia sono assai limitati, e devono essere considerati come *una buona promessa per l'avvenire, non già come l'esito completo e sicuro,* il quale dobbiamo ancora attendere da ulteriori ricerche.

II.

Intervento chirurgico.

In simili condizioni non potendosi attendere dalla sieroterapia alcun decisivo vantaggio nella cura della peste, in quale modo dovrà esplicarsi l'opera del medico di fronte all'ammalato?

Basta aver avuto occasione di esaminare un bubbone pestoso nel periodo più critico della malattia (3°-5° giorno) per convincersi che non è possibile sperare dalla sieroterapia soltanto la distruzione della massa necrosata dei ganghi linfatici, quando già la fagocitosi non può efficacemente svolgersi in un tessuto morto, mentre i bacilli pestosi vi si sviluppano rapidamente continuando ad eliminare tossine alle quali si aggiungono gli altri veleni solubili dei corpi bacterici e degli elementi del tessuto in disfacimento, e quelli prodotti da altri eventuali bacteri presenti quasi sempre nel bubbone primario insieme coi germi specifici.

L'evoluzione naturale della malattia indica quale debba essere il metodo razionale di cura.

Nei casi di guarigione spontanea la febbre cade *per crisi* dopo 24-48 ore, e la infezione si arresta prima della formazione di un vero bubbone, limitandosi alla infiammazione di uno o due gangli. In altri casi la guarigione spontanea può avvenire in un periodo più inoltrato della malattia, quando il bubbone è completamente sviluppato, vale a dire, quando la infiammazione attinge la maggioranza o tutti i gangli di una determinata regione; ma in questi casi il bubbone già comincia a presentarsi fluttuante dopo il periodo critico (3°-5° giorno), e segue poi la fase di rammollimento e di sup-

purazione colla fuoruscita spontanea del pus verso il 10°-15° giorno, se l'incisione non è fatta a tempo. Perciò si devono considerare di prognosi benigna tutti i casi in cui il bacillo pestoso trovasi associato nei bubboni cogli stafilococchi piogeni — *non già perchè questi agiscano attenuandone la virulenza o la tossicità dei prodotti*, come ritennero alcuni osservatori — ma perchè l'intervento di questi bacterî nella fase di suppurazione favorisce più rapidamente la risoluzione della malattia collo svuotamento all'esterno del focolaio di infezione.

Ma quando per altre condizioni accade che il pus non sia a tempo eliminato, ne consegue sicuramente la morte o per infezione generale o per cachessia da lenta intossicazione. È talmente evidente il beneficio dello svuotamento rapido dei prodotti infettanti e tossici accumulati nel bubbone, per effetto della suppurazione determinata dagli stafilococchi piogeni, che fino dalla più remota antichità la cura della peste consisteva appunto nel tentare con qualunque mezzo la suppurazione e l'apertura dei bubboni. E anche recentemente uno dei più distinti medici pratici di Alessandria d'Egitto riteneva utile di praticare persino la inoculazione di colture di stafilococchi piogeni nei bubboni pestosi a scopo di cura, quando questi non manifestavano la tendenza alla suppurazione (21).

Il contrario avviene quando il bacillo pestoso è associato con bacterî setticemici (diplococco) o collo streptococco, poichè allora si manifesta fino dall'inizio una zona di infiltrazione edematosa intorno ai gangli costituenti il bubbone, e colla compartecipazione dei tessuti circostanti e della cute nel processo infiammatorio, si rende più facile e più rapida la diffusione dei bacilli pestosi fuori dei gangli primieramente infetti, e quindi l'infezione generale.

Le condizioni in cui vediamo svolgersi la cura spontanea della peste, indicano il metodo da seguire nel trattamento della medesima: *o la possibilità di arrestare il processo infettivo nel suo inizio, ciò che possiamo conseguire in alcuni casi più lievi colla sieroterapia; o l'intervento chirurgico, quando il progressivo sviluppo dei bubboni e la gravità dei sintomi di intossicazione dimostrano che il trattamento specifico col solo siero non è sufficiente per la guarigione.* E' ciò appunto che accade ordinariamente in tutti gli ammalati di peste che ricorrono agli ospedali in un periodo troppo inoltrato della malattia, e nei casi più gravi per localizzazione, decorso o virulenza dei germi (*pestis major*).

A parte il modo di insorgenza di alcuni casi di peste e la rapidità talvolta straordinaria del processo infettivo, in tutte le forme

a bubboni dal punto di vista patologico e della cura non possiamo considerare in modo diverso quanto avviene per la peste da ciò che accade per altre linfangioiti e linfadeniti di carattere maligno, dove nessun medico può pensare di applicare il siero come antidoto, prima di intervenire con un atto operativo. La sola differenza sta in ciò che nella peste i fenomeni locali sono meno evidenti di fronte ai fatti generali determinati dalla intossicazione che parte dal focolaio primitivo, mentre nelle altre linfadeniti le condizioni locali attirano più facilmente l'attenzione dell'osservatore e inducono all'intervento chirurgico già prima che si manifestino i sintomi della intossicazione e l'infezione generale.

Dalla pratica acquisita nella cura della peste, specialmente nell'Ospedale Marittimo Federale in Rio de Janeiro, posso senza esitazione affermare che la grande mortalilà che si osserva negli ospedali di peste, risulta dalla mancanza o dal ritardo dell'intervento chirurgico, poichè la infezione per un periodo di 3-5 giorni o più, rimane sempre localizzata nel bubbone primario, e nelle vie linfatiche vicine, e può essere vinta colla eliminazione della parte infetta, quando la cura col solo siero riesce evidentemente inefficace.

Il risultato di numerose ricerche microscopiche e batteriologiche eseguite col concorso dei dottori Gomes e Guimarães del Laboratorio Batteriologico Federale, per stabilire la via di diffusione dei bacilli dal punto di penetrazione al bubbone e nei diversi stadî di sviluppo del medesimo, mi convinse della opportunità dell'intervento chirurgico immediato nella cura della peste, e con una operazione radicale, la *estirpazione dei bubboni.*

In 82 pestosi che presentavano flictene, o foruncoli, o altre lesioni cutanee primitive, non fu possibile di riscontrare bacilli nella linfa estratta lungo il decorso dei vasi linfatici dalla lesione primaria fino al bubbone iniziale, nè nei tessuti circostanti fuori della capsula dei gangli.

Da questi risultati si deve concludere che il bacillo pestoso non incontra condizioni favorevoli di sviluppo nel decorso lungo i vasi linfatici, e che solamente nei gangli si stabilisce il vero focolaio di infezione. Nello stesso bubbone la diffusione dei bacilli procede in modo graduale da ganglio a ganglio, e successivamente in tutti i gangli di una regione prima di passare in altra; e sempre decorre nel senso della circolazione della linfa dalle parti più superficiali alle profonde, non mai per le vie sanguigne o con flogosi dei vasi linfatici intermediari, a meno che insieme col bacillo pestoso non

siano associati altri bacteri (diplococco, streptococco), nel qual caso già fino dalla lesione primaria si osservano sempre linfangioiti, flebiti ed edema più o meno diffusi.

Se, per esempio, il bubbone primario è femorale localizzato al vertice del triangolo di Scarpa, come ordinariamente accade, la infezione si propaga a tutti i gangli inguinali superficiali prima di attingere i gangli profondi, situati davanti al foro crurale, e solamente per questa via i bacilli passano poi nei gangli della cavità pelvica, tanto che in un primo tempo coll'esame microscopico e batteriologico possiamo constatare l'infezione dei gangli inguino-crurali, quando quelli pelvici sono ancora intatti. Così pure se il bubbone è ascellare e costituito dalla tumefazione del ganglio situato all'angolo anteriore interno della cavità ascellare, dietro il bordo esterno del gran pettorale, la infezione si propaga a tutti i gangli della regione prima di interessare la pleiade ganglionare sub-clavicolare. Nei bubboni cervicali ancorchè determinati da amigdaliti pestose primarie ho constatato limitarsi per giorni il processo infettivo in uno o due gangli della regione retro-maxillare o cervicale superiore, senza diffondersi alla pleiade media e inferiore della regione del collo o della sopra-clavicolare.

Anche dall'esame isto-patologico dei tessuti è facile rilevare che il modo di infezione del bacillo-pestoso nei gangli stessi, come in altri tessuti in cui parrebbe più facile una diffusione del processo rapida e generale, procede invece sempre per gradi, in piccoli focolai, prima localizzati negli spazi linfatici, più tardi confluenti col progredire della distruzione del tessuto [Aoyama (22), Albrecht e Ghon (23), Bandi e Stagnitta (24), P. White (25), Flexner (26), Babes e Levaditi (27), Dürck (28), Hassan Hamdi (29)].

L'infezione del ganglio parte dal *sinus* e si svolge da uno e più focolai di bacilli che invadono gradatamente la massa del parenchima infiltrato da leucociti ordinariamente polinucleati, che si addensano alla periferia dei follicoli e nella parte corticale dei raggi midollari, intorno ai punti lesi. Seguono poi nel tessuto le emorragie che concorrono a distruggere completamente o quasi il tessuto adenoide, per cui della struttura normale del ganglio più nulla si può riconoscere. Le colonie di bacilli annidati nel tessuto ingrandiscono, si fondono, estendendosi verso la periferia, mentre la massa residuale cade in necrosi, e solo allora si iniziano nell'ammalato i fenomeni più gravi della infezione e tossici Il processo tipico di *coagulazione fibrillare* mancante o quasi di fibrina che si forma dentro e attorno ai vasi nella massa del tessuto necrosato del ganglio pestoso, così bene studiato da Albrecht e Ghon e da essi ritenuto come lesione caratteristica del bubbone primario pestoso, è indizio e prodotto di questa fase di intossicazione specifica, perchè manca completamente nei gangli dei casi più lievi che si avviano a guarigione spontanea e in quelli a decorso setticemico per infezione gastro-intestinale.

Queste alterazioni patologiche caratteristiche del bubbone primario lo differenziano dai secondari, e corrispondono a quelle dei focolai primari di altri organi (tonsille, polmoni); rappresentano quindi il primo adattamento del virus nel nuovo ospite, nei punti dove i bacilli trovano le condizioni migliori per acquisire la virulenza e svolgere la successiva attività tossica e infettante. Perciò vediamo che queste lesioni primarie nelle vie linfatiche sono sperimentalmente più facili a riprodursi con culture di virulenza attenuata, mentre quando i bacilli hanno raggiunto con diversi passaggi nella stessa specie animale la massima attività, non più si manifestano, avendosi allora una quasi immediata diffusione generale, specialmente se l'infezione è avvenuta per le mucose: però anche in questi casi all'inizio si rende evidente una lesione del sistema linfatico prima del passaggio dei bacilli nel sangue, ma senza il carattere di localizzazione in focolai necrotici.

Il reperto anatomo-patologico osservato in alcuni casi anche da Albrecht e Ghon e Hassan Hamdi, i quali notarono più specialmente nei focolai necrotici dei bubboni primari l'accumulo dei bacilli intorno e dentro le vene e nella capsula e tessuto peri-capsulare, non può invalidare le mie osserva-

zioni eseguite in bubboni ancora nell'inizio della malattia, quando non era ancora raggiunto lo stadio setticemico. Anche l'esame isto-patologico conferma che il passaggio dei bacilli dal ganglio nelle vie sanguigne per le lesioni della parete vasale, avviene in un periodo tardivo. Il ganglio rappresenta quindi un vero filtro pei bacilli pestosi penetrati per la via della cute e ne arresta per un tempo più o meno lungo la marcia progressiva. Ciò del resto corrisponde al risultato delle ricerche batteriologiche, le quali dimostrano nel modo più evidente che ordinariamente prima del terzo giorno ben di rado si possono riscontrare i bacilli nel circolo sanguigno, anche prelevando per le culture notevoli quantità di sangue (fino a 10-20 centimetri cubi nelle mie esperienze) e da vasi in diretto rapporto col bubbone primario.

Da queste osservazioni risulta evidente la necessità di procedere alla immediata estirpazione del bubbone primario, e si comprende che la possibilità della cura in una malattia di carattere rapidamente infettante e tossico come la peste, sarà tanto più sicura quanto più pronta e diligente è la eliminazione della parte infetta che rappresenta la localizzazione primaria dei bacilli dentro l'organismo, e il punto di partenza della infezione generale. Alle stesse conclusioni sono pervenuti Albrecht e Ghon (20) della Commissione austriaca per lo studio della peste in India, esprimendo il giudizio che nella cura della peste *non dovesse mai essere dimenticata la estirpazione del bubbone primario non ostante l'uso del siero.*

Jamagiwa (31) ha pure dimostrato come la estirpazione sollecita dei gangli infetti sia razionale e benefica. Bandi (32) in alcune esperienze, da me consigliate, ha pure ottenuto buoni risultati negli animali, benchè le difficoltà di una accurata medicazione e il decorso più rapido della infezione per la quantità e virulenza del materiale inoculato, rendano nei medesimi assai meno evidenti gli effetti dell'atto operativo.

***

In tutti gli studi clinici più recenti sulla peste non fu tenuto in debito conto ciò che la pratica empirica del passato aveva conquistato in ordine alla cura chirurgica della peste, in epidemie ben più esiziali delle presenti per virulenza dei germi e per gravità dei casi. Fino dai più antichi studi sulla peste vediamo affermato il principio che la guarigione doveva essere condizionata allo svuotamento rapido dei bubboni; e per evitare emorragie si consigliava l'uso dei caustici o del cauterio attuale distruggendo fino ai tessuti sani. In tutti i vecchi trattati di cura della peste è indicato di provocare in primo tempo la suppurazione, ma *di non attendere troppo* quando questa ritardava, e di provvedere sollecitamente colla inci-

sione e coi caustici quando la suppurazione non era ancora manifesta al 2°-3° giorno.

Le prime cognizioni sulla cura chirurgica della peste risalgono ad Hippocrate (33), e Archigene ricordato da Galeno (34), ma specialmente ai medici arabi (Ebu-Sina-Avicenna, Beitar, Isaac Iudeus, Rhazes), e furono poi apprese dai nostri medici medioevali all'epoca delle Crociate in Oriente, dove ancora oggidì gli empirici indigeni trattano i bubboni pestosi con incisioni profonde e coll'applicazione di setoni caustici e col ferro rovente.

Nelle epidemie che desolarono la Francia nel 1500, per opera specialmente di Ambrois Paré (35) e della sua scuola, la cura chirurgica della peste venne affermandosi come l'unico metodo positivo, efficace, in mezzo a tutti gli altri stravaganti rimedi proposti dell'empirismo. Identici risultati ottennero il Settala (36) e Tadino (37) nella famosa peste di Milano del 1630. In seguito, nella epidemia di Marsiglia del 1720, colle migliorate cognizioni di pratica e dello studio dell'anatomia vediamo introdotta oltre alla incisione prima della suppurazione e alla medicazione cogli antisettici (*detersivi*) di quel tempo (acqua salata e aceto) anche la estirpazione dei bubboni col metodo indicato dal Manget (38), corrispondente a quello attualmente proposto.

È notevole il giudizio costante di tutti gli antichi studiosi della peste che l'esito della cura fosse essenzialmente condizionato a due momenti, molto bene precisati dal Settala in questo consiglio: *estrarre in ogni modo e quanto prima la materia, acciocchè trattenuta non sparga il suo veleno per tutto il corpo.* La necessità ed efficacia di un intervento chirurgico immediato anche prima della suppurazione, riconosciute da chirurghi che operarono in epidemie così gravi, acquistano poi maggiore valore dal fatto che il metodo veniva consigliato esclusivamente per la peste, mentre per tutti gli altri tumori infiammatori (quali foruncoli, antraci e bubboni di altra natura) si ricorreva ai cataplasmi emollienti aspettando l'esito della suppurazione più o meno tardiva.

Come complemento a questo breve accenno delle osservazioni del passato ricordo anche l'esperimento eseguito dai medici francesi durante la guerra di conquista della Palestina (1799) (39) in cui venne stabilito come metodo generale di cura dei pestosi *la incisione di tutti i bubboni che non presentavano indizio di suppurazione, e ciò per facilitare la crisi.* Il medico privato di Napoleone a Sant' Elena, O' Meara, riferisce che prima di stabilire quest'ordine, per consiglio dei medici, Napoleone fece fare una prova sopra un certo numero di ammalati. trattandone un numero eguale coi metodi comuni (cataplasmi emollienti o rivulsivi). Il risultato fu *che ne guarirono molto più dei primi che dei secondi.*

Se dunque risultati così favorevoli e costanti si ottennero in passato quando le condizioni della malattia per virulenza e per complicanze erano assai più gravi, e mentre mancavano tutte quelle risorse tecniche e scientifiche della chirurgia moderna, sembra veramente strano che si voglia ancora dubitare della efficacia dell'intervento chirurgico nella peste bubbonica, opponendo alla evidenza dei fatti induzioni teoriche di nessun valore, perchè in contraddizione colle nuove conoscenze acquisite in questi anni sulla patogenia e clinica della peste, e con quanto ogni giorno va affermando la chirurgia moderna nella lotta contro le infezioni localizzate negli organi anche nei casi in cui si possono dire già quasi generalizzate per la estrema gravità, e per il pericolo speciale dell'atto operatorio. (Estirpazione dell'utero per endometriti settiche, la sutura intestinale nelle perforazioni da tifo, l'incisione del focolaio ed estirpazione dei gangli nell'antrace carbonchioso dei bovini e nell'adenite contagiosa dei cavalli, nelle linfo-adeniti settiche, tubercolari, ecc. dell'uomo e degli animali).

La tradizione della cura chirurgica della peste anche dopo le epidemie sopra accennate fu sempre continuata con successo, come possiamo rilevare dai dati raccolti dal Proust (40), specialmente relativi ai casi occorsi nel Lazzaretto marittimo del Farol in Marsiglia, e dal Cabanès (41). È però

merito del Cantlie (42) di avere in questi ultimi anni di nuovo richiamata l'attenzione dei medici sui vantaggi che può avere la chirurgia nella cura dei pestosi, e tanto più di fronte alla insufficienza di tutti gli altri metodi di cura finora apprestati.

***

La estirpazione dei bubboni, specialmente quando si trovano ancora nel periodo iniziale, non presenta difficoltà per un chirurgo, ed è tollerata dagli ammalati anche senza la cloronarcosi, essendo sufficiente la anestesia locale, sopratutto quando il bubbone è superficiale.

L'atto operatorio, nella maggior parte dei casi, si limita alla incisione della pelle e dell'aponeurosi superficiale, isolamento del bubbone dai tessuti circostanti, che viene praticato colle dita e la tenta, con cautele precise, per evitare la incisione o dilacerazione di grossi vasi o nervi: excisione del bubbone; ricerca dei gangli linfatici vicini, principalmente se sono emorragici o tumefatti e dolenti. Procedendo con prudenza, rare volte occorre la necessità di fare la legatura di grossi vasi, e la perdita di sangue è insignificante.

Liberato il campo da tutti i gangli infetti, si pratica una abbondante irrigazione della parte, con soluzioni antisettiche, si fa il tamponamento con medicazione umida da rinnovarsi nei giorni successivi, in cui si può intervenire in secondo tempo utilmente qualora siano rimasti residui della parte infetta.

Le osservazioni praticate nell'ospedale dei pestosi in Rio Janeiro nelle epidemie del 1900 e 1901. raggiunsero la cifra di 642, con una mortalità media di 10-15 % secondo i casi, in rapporto col numero dei bubboni, la località e la durata della malattia prima dell'intervento. Il maggior numero dei morti si verificò fra gli ammalati con più di cinque giorni di malattia, nei quali era già presumibile l'infezione generale per altre complicanze.

L'atto operativo, anche in questi casi seguìti da morte, produsse sempre benefici effetti sul decorso della malattia per un tempo più o meno lungo, tanto da far ritenere un prognostico favorevole. E sempre abbiamo potuto all'autopsia constatare che il processo già aveva in precedenza raggiunto i gangli linfatici della cavità pelvica, sopratutto quelli addossati all'apertura posteriore dell'anello inguinale, non operati in tempo utile, perchè si ritenevano non ancora infetti o per opposizione dell'ammalato. In un simile caso abbiamo potuto verificare il decesso dell'ammalato per peritonite settica, dopo quasi un mese di *stentata convalescenza*, avvenuto per svuotamento della raccolta icorosa di un ganglio pelvico nella cavità peritoneale.

Questo caso fu dei più tipici per provare la insufficienza del

siero antipestoso, anche solo per la sua azione antibacterica, perchè ne furono consumati oltre 500 cmc., e i bacilli rimasero ancora nel focolaio necrotico del ganglio, vivi e virulenti.

Le operazioni vennero tutte praticate in casi gravissimi, ordinariamente mortali (bubboni multipli in diverse regioni ascellari e inguinali, doppio inguinale e pelvico, cervicali, parotiti), e l'esito ottenuto non lascia alcun dubbio sulla efficacia del metodo.

Di fronte ai risultati conseguiti nell'ospedale di Rio de Janeiro col metodo chirurgico in confronto con tutti gli altri sistemi di cura, mi sento autorizzato a considerare senza fondamento i dubbi opposti da coloro che preferiscono attendere la morte certa dell'ammalato, anzichè applicare tutti i socorsi della chirurgia moderna per tentarne la cura col più sicuro successo.

E sono anche convinto che la esclusione di questo metodo di cura dipende da poca conoscenza clinica della malattia, e da una strana preoccupazione dei medici nell'intervento chirurgico sul sistema linfatico, anzichè da ragioni scientifiche ponderate (*).

In tutti gli operati, anche in quelli in cui furono estirpati pressochè tutti i gangli inguino-crurali di ambo i lati e ascellari, non si verificarono mai inconvenienti di nessun genere, nè all'atto operatorio, nè nelle medicazioni successive, nè in seguito per disturbi di circolazione della linfa e del sangue, o per la funzionalità degli arti. Gli ammalati uscivano dall'ospedale guariti in breve sempo nelle migliori condizioni per riprendere le loro occupazioni, incoraggiando i nuovi arrivati a chiedere l'atto operativo per essere più facilmente liberati dai tormenti della malattia. Il vantaggio più grande della estirpazione dei bubboni è appunto quello di conseguire in poche ore il benessere dell'ammalato e l'inizio della convalescenza.

Dalle curve seguenti dedotte da casi tipici di peste, trattati con diverso metodo curativo, si rileva che negli operati la febbre cade subito *per crisi*, e cessano contemporaneamente tutti i sintomi più gravi della intossicazione (il delirio, la tachicardia, la dispnea) che perdurano ancora per molto tempo, quando la cura è limitata al solo siero ed anche nei casi più lievi seguìti da guarigione spontanea.

Per dimostrare fino all'evidenza la necessità dell'intervento chirurgico nella cura razionale della peste con prove sperimentali sull'uomo stesso, molte volte abbiamo operato in casi di bubbone

(*) Il trattamento chirurgico da me proposto, venne anche applicato col più felice risultato nei casi di peste occorsi in Napoli nel 1902 e 1903, dopo l'insuccesso del siero Yersin.

doppio la estirpazione di un solo bubbone applicando nello stesso tempo la cura col siero. Il miglioramento degli ammalati era subito evidente, anche colla estirpazione di un solo bubbone: ma nei giorni successivi la temperatura ritornava ed elevarsi oltre i 39°, e persisteva lo stato sub-tifico, la tachicardia, il delirio. Completando la cura colla estirpazione del secondo bubbone, cessavano in poche ore i fenomeni della intossicazione, e l'ammalato entrava in franca convalescenza.

III.

Conclusioni.

1. Nell'ospedale dei pestosi di Rio Janeiro la mortalità fra gli ammalati trattati col solo siero antipestoso, si mantenne fra 25-50 per cento secondo i casi (*pestis minor*) e la qualità dei sieri inoculati. Bisogna però considerare che nella statistica a favore della sieroterapia sono compresi tutti i casi più lievi che ordinariamente guariscono senza cura. Ciò che rende anche molto incerto l'apprezzamento dell'effetto curativo dei sieri specifici è la estrema variabilità delle dosi in casi identici per forma e decorso clinico. I sieri finora usati si dimostrano in ogni modo assolutamente inefficaci nelle forme setticemiche (infezione per via gastro-intestinale) e nelle pneumoniti pestose, dove appunto sarebbe più necessario di poter somministrare un medicamento capace di rendere innocuo il virus specifico nell'organismo dell'ammalato.

2. La inefficacia curativa dei sieri antipestosi, ora in uso, dipende dalla deficienza del potere antibacterico e dalla mancanza pressochè assoluta di sostanze antitossiche, in quantochè gli animali utilizzati per la preparazione non sono suscettibili di assimilare e distruggere i veleni del bac. pestoso e di accumulare nel proprio sangue sostanze antibacteriche e antitossiche in quantità sufficiente per la cura dell'uomo.

A questo riguardo *i migliori risultati per la sieroterapia della peste si possono ottenere immunizzando muli, asini o bovini, con inoculazioni graduali di prodotti patologici di animali pestosi in luogo delle colture artificiali.*

3. Coi sieri artificiali di Hajem e di Fodor si ottennero pure risultati favorevoli, ma l'inconveniente di dover inoculare grandi quantità di liquido per via endovenosa, fece limitare a pochi casi l'applicazione di simile metodo curativo.

4. Colle inoculazioni endovenose di sublimato corrosivo, proposte dal Baccelli, la mortalità oscillò quasi negli stessi limiti dei sieri specifici migliori fra 30-40 per cento, e come ho già accennato in precedenza, questo metodo curativo è da raccomandarsi sopra ogni altro quando non si può avere a disposizione sieri di buona preparazione, e quando non sia possibile praticare la cura chirurgica in tempo utile. Il sublimato corrosivo agisce come un potente stimolo della fagocitosi (Gaglio), e offre il vantaggio di poter essere facilmente alla portata di ogni medico, anche in regioni dove non si può sempre sperare di avere a disposizione altri medicamenti di difficile conservazione come i sieri, tanto più che il siero antipestoso perde la sua già debole efficacia nel periodo di pochi giorni. È poi noto che il mercurio si fissa a preferenza nei linfociti dei gangli linfatici e nel plasma, costituendo così una condizione sfavorevole allo sviluppo dei bacilli pestosi, appunto nei tessuti di predilezione di questo germe infettante. Per questa ragione ritengo preferfbile l'uso del sublimato corrosivo a quello dell'acido fenico, raccomandato dal dott. Seymour (43), specialmente nei casi in cui possiamo già dimostrare la presenza dei bacilli nel sangue.

5. Nei casi più gravi (*pestis maior*), nei quali non è possibile attendere dalla sieroterapia o da altre cure locali un successo, come unica risorsa razionale di cura si presenta l'atto operativo colla estirpazione dei bubboni.

* * *

Trattando della cura chirurgica ho considerato in prima linea la estirpazione del bubbone in luogo delle altre cure locali, poichè la pratica acquisita mi persuade ad avere maggiore fiducia in questa operazione radicale.

La semplice incisione del bubbone collo svuotamento del pus e del materiale necrosato è benefica, ma non ha effetto così rapido e durevole nell'arrestare la marcia della infezione, poichè rimangono sempre in luogo i residui del tessuto infiltrati di bacilli, e si rende meno facile e più lenta l'azione diretta della medicazione locale.

Insieme con le compresse imbevute di soluzioni disinfettanti tepide (sublimato e acido fenico), è molto indicata come cura locale per limitare la diffusione del processo durante la formazione dei bubboni, l'iniezione di soluzioni disinfettanti (sublimato corrosivo 1 per mille, acido fenico e derivati 1-2 per cento) intorno e dentro la massa del bubbone, specialmente quando dall'edema circostante o dalla periade-

nite adesiva si può subito sospettare un processo infettivo combinato del bac. pestoso insieme con altri bacteri (streptococco, diplococco). Sarà utile di ricorrere a questi mezzi quando non sia possibile, o si debba troppo attendere l'operazione radicale.

Tutte le altre cure locali devono essere considerate più dannose che utili, perchè non possono esercitare alcuna azione sui bacilli localizzati nel tessuto del ganglio linfatico, e fanno invece perdere un tempo preziosissimo in luogo di applicare la cura più razionale e di esito sicuro.

E un errore imperdonabile aspettare la suppurazione del bubbone, prima di decidere l'intervento chirurgico, poichè o l'ammalato soccombe per il rapido progresso della infezione, o per effetto dei prodotti tossici, che *non possono essere neutralizzati dall'azione curativa del siero.*

Non si deve tenere in considerazione nè la costituzione dell'individuo, nè calcolare troppo sulla resistenza individuale dell'ammalato: finchè rimane il bubbone le condizioni della cura risultano sempre più difficili e pericolose, e quasi sempre occorre la necessità di praticare più tardi l'operazione in condizioni molto più gravi sia per debilitazione dell'ammalato, sia perchè il tumore molto sviluppato distrugge le relazioni anatomiche della regione, sia per causa delle complicanze come flebiti, linfangioiti, infiltrazioni icorose lungo le guaine muscolari con pericolo di versamento nelle cavità.

Quando non è possibile di provvedere nel domicilio stesso dell'ammalato alla cura chirurgica, si deve almeno praticare in luogo le inoculazioni endovenose di siero specifico (20-40 cm.^{3}) o di sublimato (1-2 centigr. della soluzione Baccelli), e nello stesso tempo rimovere colla maggiore sollecitudine l'ammalato per l'ospedale, dove sarà applicato il trattamento conveniente. *L'assistenza degli appestati esige perciò conoscenza e pratica speciale della malattia nei medici incaricati delle visite ed ispezioni a domicilio, e l'abilità per le inoculazioni endovenose e ipodermiche di siero. Nell'ospedale poi è indispensabile la presenza di un abile chirurgo e di chi sappia felicemente coadiuvarlo.*

Coi sistemi ora esposti dedotti da rigorose esperienze di laboratorio accompagnate ad una lunga pratica clinica della peste furono curati gli ammalati dell'ospedale Marittimo Federale di Rio de Janeiro, e i risultati conseguiti in confronto con quelli di altre località confermano pienamente le considerazioni esposte nel presente studio. Posso con tutta sicurezza affermare che quando la peste è trattata coi metodi sopra indicati, la mortalità si riduce nelle con-

dizioni e nei limiti delle altre malattie infettive e contagiose generalmente considerate assai meno gravi negli effetti.

E a tale proposito devo ancora rilevare non essere accettabile l'opinione di Scheube (44), il quale ritiene in casi di epidemia di peste difficilmente applicabile il metodo di cura chirurgico, forse a cagione dell'affollamento degli ammalati, mentre l'esercizio della chirurgia specialmente in casi di guerra ha dimostrato di poter bastare nelle più gravi contingenze, quali non si verificano mai nelle più esiziali epidemie di peste.

In tutti gli ospedali di Bombay comparando il movimento giornaliero degli ammalati, così minuziosamente redatto nelle statistiche della Commissione Inglese, è facile rilevare che un corpo di chirurghi in sostituzione o in aiuto dei medici, potrebbe a tempo e opportunamente provvedere alle esigenze del servizio anche nell'acme del periodo epidemico.

***

Chiudo il presente studio ricordando con vero sentimento di riconoscenza l'interesse e le agevolazioni accordatimi dal governo del Brasile durante il mio lungo soggiorno in quel paese. Specialmente all'opera illuminata del direttore della sanità pubblica prof. dott. Nuno de Andrade devo il compimento di questi studi, improntati al desiderio da lui espresso nell'affidarmi la direzione tecnica della cura dei pestosi, di avere cioè un risultato pratico e sicuro, comparando *tutti i metodi vecchi e nuovi meglio indicati per soccorrere l'ammalato.* Ricordo inoltre con indimenticabile affetto tutti i compagni di lavoro nell'ospedale d'isolamento in Jurujuba, dott. Em. Gomes, Capo del Labor. Batter. Federale, dott. Guimarães, assistente, ora defunto, dottor Tavarez Macedo, direttore dell'ospedale, dott. Carvalho-Leite, vicedirettore e gli altri medici ed interni (Dr. A. Pedro, Dr. Aragão, F. Mario e Laudelino Gomes), il preparatore A. Tobias Reis, l'infermiere capo A. de Carvalho, che mi coadiuvarono colle loro osservazioni e colla maggiore deferenza di colleghi e di studiosi.

IV.

Appendice.

Come appendice riporto alcune note cliniche dei casi più tipici scelti fra le centinaia passati sotto la nostra osservazione nell'Hospital Marittimo Paula Candido in Jurujuba (Rio de Janeiro), che nell'occasione dell'epidemia di peste era adibito esclusivamente per ricovero dei pestosi.

L'ospedale è situato in una insenatura della baia di Jurujuba, posta di fronte alla città di Rio de Janeiro, e dista da questa circa 2 miglia marittime. Si compone di 4 padiglioni di costruzione moderna, collegati da una veranda, di alcune sovrapposizioni nella parte mediana, e di un corpo avanzato unico come riparto di amministrazione (tav. VII e VIII). E' capace di circa 800 letti. Il padiglione di osservazione è costruito sopra un'isoletta davanti al ponte di sbarco dell'ospedale.

Gli ammalati dai diversi punti della città erano trasferiti ad una infermeria di deposito presso un molo appartato (Cães da Saude), e quindi con una infermeria galleggiante, rimorchiata da un vaporino, venivano trasportati all'ospedale.

Tutti questi servizi erano disimpegnati colla maggior cura e speditezza, e in modo che l'assistenza dell'ammalato non lasciasse nulla a desiderare.

***

Nella classificazione delle forme cliniche della peste preferisco seguire i criteri esposti dalla Commissione Inglese, e nel ben noto trattato del Manson (45), salvo ciò che ho già osservato nel mio precedente studio circa le forme setticemiche da infezione gastro-intestinale.

Senza rilevare il quadro clinico di ciascun ammalato, per *pestis minor* s'intende la forma più lieve e mite della peste, compresi i casi abortivi, atipici e le così dette forme ambulatorie. I sintomi di queste forme più lievi di peste sono: dolor di testa, insonnia, leggera piressia che dura solo per poche ore, sensibilità e dolore in corrispondenza di una o più pleiadi gangliari, di solito all'inguine, dove spesso si nota una tumefazione: qualche volta nausea e vomito. La durata di questi sintomi può essere di 2-3 giorni; non di rado però la tumefazione dei gangli è più persistente, e per effetto della suppurazione si prolunga per 10-20, anche 30 giorni. Tutti i casi finiscono colla guarigione.

Per *pestis maior* si comprendono tutti i casi a decorso rapido in cui i primi sintomi sempre più gravi si confondono e susseguono rapidamente con quelli di una grave intossicazione generale (vomito e diarrea biliosi, cefalea intensa più spesso frontale, insonnia, vertigini, palpitazioni, nausea, stupore, letargia e prostrazione generale). La temperatura si eleva rapidamente con brevi ed inconstanti oscillazioni periodiche: polso e respirazione frequentissimi, pelle calda e arida. L'ammalato ha un'andatura instabile e barcollante, è impossibilitato o incapace di rispondere alle domande, perchè il processo mentale è lento e nelle condizioni più tipiche di una lieve ubbriachezza. I bubboni, spesso multipli, sono molto sviluppati, dolorosissimi e resistenti alla palpazione.

In questi casi l'esito ordinario è la morte per improvviso arresto della funzione cardiaca, o più di rado per complicanze o per esaurimento generale quando ha luogo una prolungata suppurazione di uno o più bubboni.

***

Trattando della sieroterapia della peste ho rilevato che i risultati sono poco o punto attendibili, perchè nei soli casi più lievi (*pestis minor*) il siero può essere usato con successo quasi costante, sempre però nelle condizioni in cui anche altri metodi di cura danno eguale risultato.

Nei casi ordinari e più gravi essa fallisce completamente, sopratutto per la mancanza di azione antitossica; ed in ogni modo non è mai possibile di stabilire un rapporto costante ed esatto fra le dosi di siero e l'andamento clinico della infezione.

Nei casi seguenti in condizioni di malattia quasi identiche, si rileva la grande variabilità delle dosi di siero con effetti spesso contrari, e in ogni caso la persistenza della tachicardia e degli altri disturbi nervosi anche dopo che poteva ritenersi raggiunta una crisi favorevole.

Risultati identici si hanno nei casi 509, 227 e 374, 356 trattati esclusivamente colle iniezioni endovenose di sublimato, e nei casi di controllo lasciati senza alcun trattamento.

Pestis minor (v. Tav. IX).

Casi senza alcun trattamento (Controlli).

Osservazione n. 170. — D. Alonzo, spagnuolo, 40 anni, entrato 3 giugno, uscito 25 luglio. (V. curva N. 170).

Osservazione n. 153. — D. F. da Costa, portoghese, 26 anni, entrato 24 maggio, uscito 30 giugno. (V. curva N. 153).

Osservazione n. 152. — D. Estevez, portoghese, 25 anni, entrato 23 maggio, uscito 15 giugno. (V. curva N. 152).

Osservazione n. 505. — I. H. da Couto, brasiliano di colore nero, entrato 12 agosto, uscito 22 agosto. (V. curva N. 505).

***

Casi trattati con iniezioni endovenose di sublimato corrosivo (formola Baccelli = sublimato corrosivo 0.10 centigr., cloruro di sodio 0.10 - 0.40 centigr., acqua distillata sterile 100 gr.). Dosi: di sublimato per dose da gr. 0.002-0.004-0.006. Dopo usate in un soggetto le dosi più piccole si arriva fino a gr. 0.01 per volta. Il sublimato si trasforma subito in albubinato.

Osservazione n. 509. — A. F. de Sourez, portoghese, 26 anni. Entrato il 14 agosto, uscito il 22 agosto. (V. curva N. 509).

Osservazione n. 227. — A. de Mello. brasiliano, 5 anni. Entrato il 14 giugno, uscito il 3 luglio. (V. curva N. 227).

Osservazione n. 374. — I. A. Camargo, brasiliano, 18 anni, pardo. Entrato l'11 luglio, uscito il 28 luglio. (V. curva N. 374).

Osservazione n. 356. — M. C. Bispo, brasiliano, 24 anni, pardo. Entrato il 25 giugno, uscito il 13 luglio. (V. curva N. 356).

***

Casi trattati col siero. — Il siero veniva ordinariamente inoculato per via endovenosa in forti dosi (30-50 cm.³), ripetute nei primi giorni e in seguito a giorni alterni. Si confronti l'andamento clinico di questi casi tracciato nelle curve con quelli precedenti.

Osservazione n. 139. — A. I. Vieira, brasiliano, 6 anni. Piccolo bubbone inguinale sinistro, leggero stupore. Entrato il 18 aprile, uscito il 2 maggio, guarito. (V. curva N. 139).

Osservazione n. 147. — I. F. Roval, portoghese, 11 anni. Bubbone inguinale sinistro. Entrato il 19 aprile, uscito il 3 maggio, guarito. (V. curva N. 147).

Osservazione n. 186. — M. C. Padilha, brasiliano, 44 anni, nero. Bubbone inguinale destro. Entrato il 18 giugno, uscito il 9 luglio. guarito. (V. curva N. 186).

Osservazione n. 163. — L. R. d'Oliveira, brasiliana, 40 anni. Bubbone femorale sinistro. Entrata il 27 maggio, uscita il 14 giugno, guarita. (V. curva N. 163).

Osservazione n. 140. — C. de Castro, portoghese, 19 anni. Bubbone inguinale sinistro. Entrata il 18 aprile, uscita il 2 maggio, guarita. (V. curva N. 140).

Osservazione n. 178. — A. I. da Silva, brasiliano, 32 anni. Bubbone inguinale femorale sinistro. Entrato l'8 giugno, uscito il 22 giugno, guarito. (V. curva N. 178).

***

Nei casi operati le condizioni dell'ammalato migliorano invece di un tratto, spesso in modo impressionante data la gravità della malattia. Parecchi medici anche stranieri (Hawelburg, Walter Wyman, Malta) che seguirono le osservazioni nell'ospedale di Jurujuba, non trovavano migliore espressione pel loro giudizio se non col dire che si trattava di *vere resurrezioni*.

Mi limito a riportare alcuni dei casi più gravi in cui già erano *presenti i bacilli nel sangue*, e quindi in istato preagonico. Noto che tutte le altre curve termiche e del polso nei casi operati si sovrappongono a quelle dei numeri 298 e 472; si ha cioè costantemente l'arresto immediato della elevazione termica, e una marcatissima attenuazione di tutti i più gravi sintomi della infezione, senza pericolo di riprese successive se non nel caso che siano rimasti altri bubboni non operati.

Il caso n. 362 (fig. IV) è specialmente notevole, perchè si trattava dell'unica persona (una lavandaia) fra gli addetti ai servizi degli ospedali non vaccinata, e fu colpita dalla peste in forma molto grave. Nel rimanente personale, e specialmente fra gli infermieri e i medici dell'ospedale di Jurujuba ben più esposti al pericolo della infezione per le necessità stesse del metodo di cura, dovendosi operare e medicare ogni giorno diecine di ammalati, non si ebbero casi nè meno sospetti: e ciò a mio giudizio è dovuto più che alle precauzioni generali rigorosissime, al fatto della immunità acquisita colla vaccinazione antipestosa. Questo metodo di profilassi applicato anche al personale del Laboratorio Sieroterapico di Messina valse ad allontanare ogni pericolo di infezione, benchè vi si lavorasse con materiale virulentissimo e con metodi che esponevano con maggiore facilità a contrarre la malattia.

Pestis maior (v. Tav. X).

Casi trattati col siero. — Riporto tre osservazioni tipiche per dimostrare la inefficacia della sieroterapia nelle forme gravi di peste (*Pestis maior*). Per altri dettagli e curve di casi osservati, vedasi la I parte del mio studio nella Zeitschr. f. Hygiene XLIV.

Osservazione n. 197. — M. R. Manghera, portoghese, 23 anni. Bubbone doppio femorale inguinale ed iliaco a destra. Entrato il 27 aprile, morto il 6 maggio. (V. curva N. 197).

Osservazione n. 190. — A. Eugenia (cognome ignoto), brasiliana, 60 anni, negra. Bubbone femorale inguinale e crurale destro e femorale a sinistra. Entrata il 22 aprile, morta il 27 aprile. (V. curva N. 190).

Osservazione n. 378. — I. M. Ribeiro, brasiliano, 23 anni. Bubbone cervicale, sopraclavicolare, bubbone inguinale femorale destro. Entrato il 10 luglio, morto il 17 luglio. (V. curva N. 378).

Cura chirurgica.

Osservazione n. 350. — N. P. dos Santos, brasiliano, 4 anni. Bubbone cervicale a sinistra, doppio inguinale e ascellare destro: 7 luglio estirpazione dei bubboni cervicale ed ascellare, 9 luglio estirpazione dei bubboni inguinali. Entrato il 6 luglio, uscito il 18 agosto, guarito. (Vedi Fig. IV e curva N. 350).

Osservazione n. 247. — O. Gomes, brasiliano, 13 anni. Entrato il 13 giugno, uscito l'11 agosto, guarito. Bubbone inguinale e iliaco destro. Operato il 17 luglio risultando inefficaci le altre cure. (V. curva N. 247).

Osservazione n. 378. — A. dos Santos, brasiliano, 36 anni, negro. Entrato il 29 giugno, uscito il 22 agosto, guarito. Bubbone iliaco e inguinale sinistro, operato 1° luglio. (V. curva N. 378).

Osservazione n. 159. — I. Vieita, spagnuolo, 26 anni. Entrato il 16 maggio, uscito il 15 giugno, guarito. Doppio bubbone femorale inguinale e illaco a destra, operato il 16 maggio dal lato destro, il 18 maggio dal lato sinistro. (Fig. V e curva N. 159).

Osservazione n. 434. — M. A. Fragoso, brasiliana, 43 anni. Entrata il 25 luglio, uscita il 5 settembre, guarita. Bubboni femorale, inguinale e iliaco destro, operata il 28 luglio. (V. Fig. IV e curva N. 434).

Osservazione n. 314. — R. M. Aurora, portoghese, 35 anni. Entrata il 29 giugno, uscita l'11 agosto, guarita. Bubbone femorale inguinale sinistro, operata il 30 giugno e 2 luglio. (V. Fig. IV e curva N. 314).

Osservazione n. 424. — A. F. de Gouvea, portoghese, 9 anni. Entrato il 23 luglio, uscito il 29 agosto, guarito. Bubboni multipli, doppio ascellare e cervicale, operato il 24 luglio dei bubboni cervicali (Fig. VI), il 27 luglio dei bubboni ascellari. (V. curva N. 424).

Osservazione n. 362. — M. I. de Souza, portoghese, 30 anni. Entrata il 10 luglio, uscita il 29 agosto, guarita. Bubbone inguinale e femorale sinistro, operata il 10 e 13 luglio. (Fig. IV e curva N. 362).

Osservazione n. 298. — D. Martins, portoghese, 19 anni. Entrato il 26 giugno, uscito il 22 agosto, guarito. Bubbone inguinale e iliaco destro, operato il 28 giugno. (Fig. VII e curva N. 298).

Osservazione n. 472. — Ephigenia, brasiliana, 9 anni. Entrata il 6 agosto, uscita il 5 settembre, guarita. Bubbone ascellare sinistro e femorale destro, operata il 7 agosto. (Fig. VIII e curva N. 472).

Osservazione n. 459. — F. A. Monteiro, portoghese, 18 anni. Entrato il 1° giugno, uscito l'11 agosto, guarito. Bubbone inguinale e iliaco destro, ascellare ed epitrocleare sinistro, operato (Fig. IX) il 3 giugno all'inguine, il 6 all'ascella e al braccio. (V. curva N. 459).

Osservazione n. 329. — G. Mechino, italiano, 26 anni. Entrato il 1° luglio, uscito il 18 agosto, guarito. Bubbone inguino-crurale destro e ascellare destro, esantema generale pestoso, operato il 1° luglio all'inguine, il 3 alla ascella. (Fig. X e curva N. 329).

BIBLIOGRAFIA.

1. Kitasato. Lancet, 1894. — Kitasato, Nakavaga. Twentieth Century XV, 23.
2. Yersin. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1894, 1897, 1899, C. R. de l'Ac. des Sciences, 1894. — Arch. de Méd. Navale, 1897.
3. C. Terni. Revista Medica de S. Paulo, 1900. — Journal of Tropical Medicine, n. 14-15, 1902.
4. Albrecht e Ghon. *Uber die Beulenpest in Bombay im Jahre 1897*. Wien, Aus der kais. köngl. Hof-und Staatsdruckerei, Theil II. B., s. 515.
— Gaffky Pfeiffer, Sticker, Dieudonné. *Bericht über die Thätigkeit der zur Erforschung der Pest*, ecc. Berlin. V. von Julius

Springer, 1899, S. 265. — Report of the Indian Plague Commission, vol. V, pag. 63.
5. A. Lutz. Revista Medica de S. Paulo, 1900.
6. W. C. Kossack. Brit. Med. Journal, 1900, pag. 313.
7. L. F. Childe. Brit. Med. Journal, 1897, pag. 1215.
8. Report of the Indian Plague Commission, vol. V, cap. V, pag. 269.
9. Yersin, Calmette, Borrel. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1899.
10. Lustig. *Sieroterapia*, ecc. Torino, Rosenberg e Sellier, Ed., 1899. Vedi anche: Lustig, Galeotti. Deut. Med. Woch., 1897. — Lustig, Zardo. Centr. f. Allg. Pathol. VIII, 1897. — Galeotti, Malenchini. Centr. f. Bakt., 1897. — Galeotti, Polverini. *Osservazioni e note epid.* ecc., Torino, Rosenberg e Sellier, Ed., 1898. — Galeotti e Polverini. *Su 175 casi di peste trattati col siero antibubbonico*, ecc. Firenze, 1898. — Polverini. *Serumtherapie gegen Beulenpest*, Münch. Med. Woch., n. 15, 1903.
11. Il Policlinico, 1899, pag. 441.
12. G. Gaglio. Archivio per le scienze mediche, vol. XXI, n. 13, pag. 341.
13. J. Ross. The Practitioner, 1870.
14. Arnozan e Montel. XIII Congrès internation. de méd. à Paris, 1900. Séance du 4 Août.
15. Stassano. Comp. rend. de l'Acad. des Sc., vol. 127, p. 680, 1898.
16. A. Baldoni. Bollett. della R. Accad. Medica di Roma. Anno XXXI, fasc. I.
17. W. Kolle, H. Hetsch, und R. Otto. Zeitsch. f. Hygiene, Bd. XLVIII, H. 3.
18. Markl. Cent. f. Bakter., 1898, Bd. XXIV, 1901, Bd. XXIX. Wiener med. Wochensch., 1900. Zeitsch. f. Hygiene, 1901, Bd. XXXVII; 1903, Bd. XLII.
19. Report of the Indian Plague Comm., vol. V, cap. V, pag. 281.
20. W. B. Bannerman, *Scientific Memoirs etc. Serumtherapy of Plague in India.* Calcutta, Office of the Superint. of Govern. Print. India, 1905 (New Series, n. 20) p. 37.
21. A. Valassopoulo. *La peste d'Alexandrie*, Paris A. Maloine, edit., 1901.
22. Aoyama. *Ueber die Pestepidemie in Honkong in Jahre 1894.* Mittheil. aus der med. Fakult. der Kais. Japan. Universität. Tokio, 1894, Bd. III.
23. Op. cit., pag. 486 e seg.
24. Bandi und Stagnitta-Balestreri. Zeitsch. f. Hygiene, 1899.
25. P. White. British Med. Journal, 1901. pag. 829.
26. Flexner. *The Pathology of the Bubonic Plague.* Medical Bulletin, August, 1901.
27. Babes und Levaditi. Virchow's Archiv, Bd. CL.
28. Duerck. Muenchener med. Wochensch, 1902. Verhand. der Deutsch. pathol. Gesellschaft, 1901, IV.
29. Hamdi Hassan. *Ueber die histologischen Veränderungen bei der Pest des Menschen.* Zeitsch. f. Hygiene. Bd. XLVIII. H. 3.
30. Op. cit. pag. 823.
31. Jamagiwa. Virchow's Arch. CXL Suppl. 1897.
32. Bandi. Rivista di Medicina Navale, 1901.

33. HYPPOCRATES. *Opera omnia et notis Annutii Foesii.* Francofurti, 1595. De morb. vulg. Lib. III. Sec. VII, *Status Pestibus.*

34. GALENUS. *Opera omnia. De comp. med.* Cap. 2, ad Glauc. 2-6. *De Locis affect.* Cap. 5-2. *De offic. med.* Cap. 30.

35. A. PARÉ. *Opera.* Lib. XXI. *De Peste.* Parisiis apud Jacobum Dupuys, 1582, pag. 645.

36. SETTALA. *Cura locale dei tumori pestilenziali.* Milano per G. Batta Bidelli, 1629. *De Peste et pestiferis affectibus.* Mediolani apud Jo. Bapt. Bidellium, 1622.

37. TADINO. *Ragguaglio ecc. della gran peste di Milano dell'anno 1632.* Milano per Filippo Ghisolfi, 1648. — Vedi anche: PAULI ACGINETAE. *Opus de Re Medica* ecc. Lib. 6. Cap. 34, Coloniae. Opera et impensa Jo. Soteris. Anno 1533. — PROSPERI ALPINI. *De medicina Aegyptiorum,* Libri quator. Venetiis, 1591. — BASSIANUM LAUDUM. *De origine et causa pestis Patavinae.* Venetiis. Ann. 1555. — ID. *Cura della Peste.* Ven. 1557. — MASSARIA. *De Peste.* Ven. 1597. — HIER. MERCURIALIS. *De peste praesertim de Veneta et Patavina.* Basel, 1577. — TH. JORDANUS. *Pestis Phoenomena etc. Francofurti.* Wechelus, 1576. — PROSPER BORGANTIUS. *De Peste.* Ven., 1565. — VICTOR DE BONAGENTIBUS. *Decem Problemata de Peste.* Ven., 1556. — GEORGIUS AGRICOLA. *De Peste.* Libri tres. Basel, 1554. — JOSEPHUS RIPAMONTIUS. *De Peste in 1630.* Mediolanum, 1641.

38. MANGET. *Traité de la Peste* ecc. Genève, 1721, pag. 214, 315, 551.

39. O' MEARA. *Conquête de la Palestine, 1799.* Editée par Napoléon (senza data).

40. PROUST. *La défense de l'Europe contre la peste.* Paris, 1900.

41. M. CABANÈS. Bull. gén. de thér., 30 Nov. 1899.

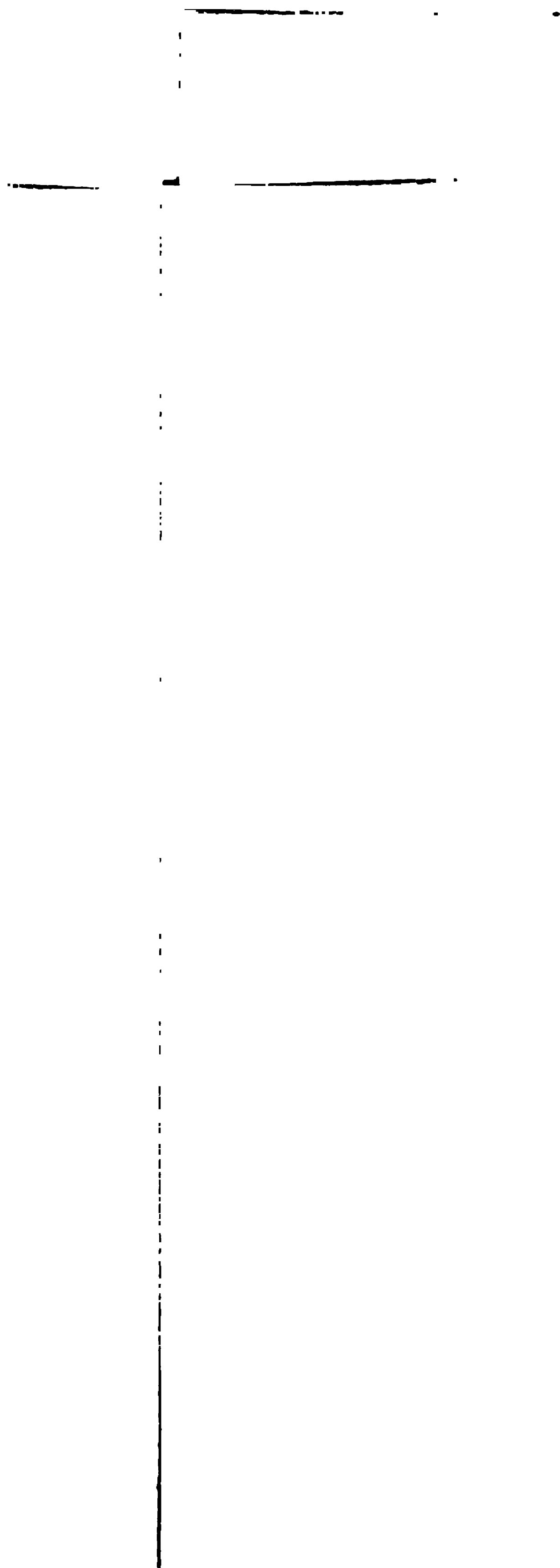
42. I. CANTLIE. Lancet, 1897, pag. 4-85. Idem. 1897, pag. 349. *Plague: how to recongnise, prevent and treat plague.* London, 1900.

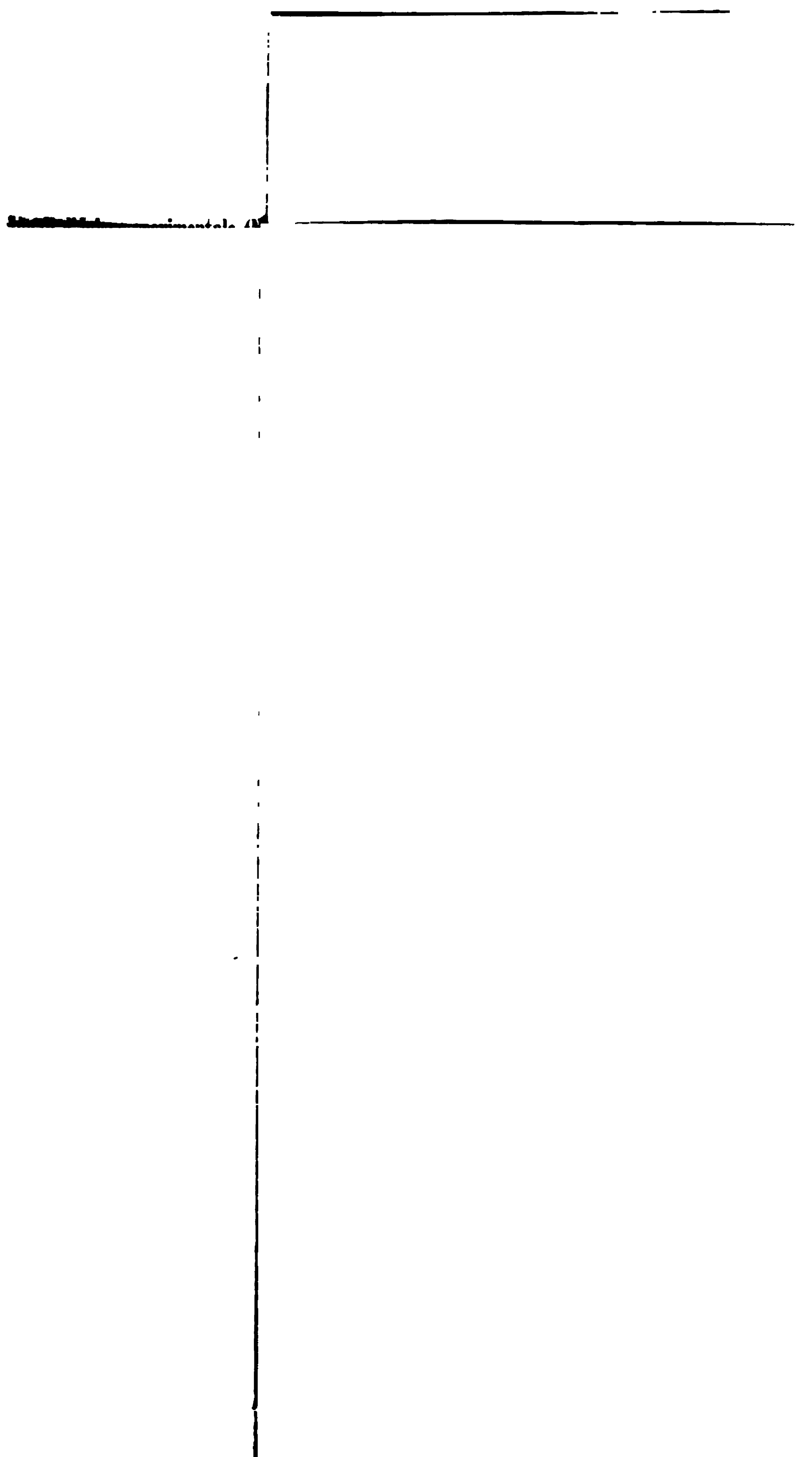
43. Report of the Indian Plague Comm. Vol. V, pag. 444.

44. SCHEUBE. *Die Krankheiten der warmen Länder.* verl. v. Gustav Fischer, Jena, 1903.

45. P. MANSON. *Tropical Diseases.* London, Cassel & Comp. Ltd., 1903.

LO TERNI — *Studi sulla peste.*





La malaria in Italia durante il 1905

Ricerche epidemiologiche e profilattiche

Riassunto di A. CELLI.

Le stazioni per lo studio epidemiologico e profilattico della malaria in Italia, durante il 1905, furono anche più numerose che negli anni precedenti (1) in ispecie nel Mezzogiorno e nelle Isole.

Nel volume VII degli Atti della Società vengono pubblicate le *relazioni speciali* dei seguenti autori:

Per l' *Italia superiore*: dottori Brignone e Alzona (Alessandria); dottori Vaccino N. ed A. (Vercellese); dottori Omodei-Zorini e Pezza (Lomellina); prof. Bordoni-Uffreduzzi e dott. Bettinetti (Milano); dott. Polettini (Veronese); dott. Soliani (Mantova);

Per l' *Italia media*: dott. Tusini (Modenese); dott. Orta (Ferrarese); dott. Boccanera e medici comunali (Agro Romano); dott. Tafuri (Bassa valle dell' Aniene);

Per l'*Italia meridionale*: prof. Rossi e dott. Guarnieri (Versante tirreno), dott. Martirano (Versante adriatico e ionico) con molti medici del Mezzogiorno continentale; dott. Nicastro (Capitanata); dott. Tecce (Basilicata); dott. Lillo (Calabria); dott. Albini (Ferrovie meridionali);

Per la *Sicilia*: dott. Tafuri e varii medici; dott. Barbagallo (Catania); Croce Rossa (Miniere di solfo, ecc.); ingegner Sbacchi (Ferrovia sicula occidentale);

Per la *Sardegna*: prof. Casagrandi e varii medici della provincia di Cagliari; dott. Andrea Conti (Sassarese); dott. Melloni-Satta (Ferrovie reali sarde); dott. Varese (Ferrovie secondarie sarde); dott. Frongia (Miniere);

(1) V. questi Annali, vol. XII-XV, 1901-1905.

Da un estremo all' altro d'Italia: Ispettorato di sanità militare per l'esercito.

Nello stesso volume VII sono pubblicate le *relazioni su temi generali*, come quelle sui Culicidi (prof. Galli-Valerio e J. Rochaz-de Jongh); sull'anofelismo senza malaria (Tiraboschi); sul tannato di chinina (prof. Cervello, prof. Gaglio e dottori Flamini, Cagiati, Mazzitelli); sulle recidive nella malaria (prof. Carducci); sulle antiemolisine ed emolisine coctostabili (prof. Casagrandi); sulla presenza di emolisine nella malaria umana (prof. De Blasi); sulla morfologia e biologia del parasita della quartana (dott. Levi Della Vida); e sulla dermatosi delle risaiole (dott. Orta).

Per la preziosa collaborazione del prof. Gabritchewsky di Mosca e dei colleghi della Società per gli studi della malaria in Russia, nonchè del dott. Jancsò di Kolozsvàr (Ungheria) possiamo anche in quest'anno fare utilissimi confronti internazionali (1).

Rimandando il lettore alle singole monografie (2) degli egregi soci della nostra Società, esporrò secondo il solito qui in breve *quanto per sè e come termine di confronto è più necessario a conoscersi e di più importante accadde nello scorso anno 1905 intorno alla epidemiologia ed alla profilassi della malaria.*

PARTE I.

Epidemiologia della malaria.

1. — Andamento generale dell'epidemia.

L'annata epidemica del 1905 fu in generale eccezionalmente mite, quindi assai più mite che la precedente, in tutta l'Italia superiore (Veneto compreso) e in buona parte dell'Italia centrale.

Nel Lazio invece e nel Mezzogiorno l'epidemia fu generalmente di una intensità assai elevata.

Ad es. in alcuni luoghi del Mezzogiorno (Atella in Basilicata, Roseto e Crucoli in Calabria) dal 70 al 100 % della popolazione rimase colpita.

Nelle Isole invece, tutto considerato, l'anno epidemico non fu dei più gravi.

---

(1) La interessante relazione dei fratelli Sergent (Algeria) arrivò troppo tardi per essere pubblicata in questo volume: chi vorrà consultarla veda gli *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906.

(2) V. Atti della Società per gli studi della Malaria, vol. VII, 1906.

Nell'Italia superiore meglio che negli anni antecedenti venne in chiaro il fatto che in una stessa regione di malaria lieve alcune località sono intensamente battute dalle febbri, mentre altre, anche vicinissime a quelle, lo sono molto meno e perfino poco o niente. Così una località che un anno soffre una percentuale minima di malaria, può l'anno venturo avere una grave epidemia e viceversa.

Un fatto simile, sebbene con minore evidenza, si osservò altresì, in regioni di malaria grave.

Di *confronti internazionali* abbiamo che nel Portogallo (1) il massimo di mortalità per malaria, nei luoghi più infetti è appena del 6.17 $^{\circ}/_{\circ\circ\circ}$ abitanti. Nell'Ungheria poi (Jancsò) è avvenuto quel che nell' Italia superiore, cioè negli ultimi 30-35 anni l'epidemia, attraverso a qualche oscillazione, è andata riducendosi ai minimi termini, e in molti distretti è divenuta appena sporadica.

Nella Russia invece (Gabritchewsky) si mantiene grave come nella nostra Italia meridionale e insulare, e si va da luoghi colpiti in proporzione di 14,3-24.4 % abitanti nel Woronege fino a 80 % nel Caucaso.

Fortunatamente anche nella passata stagione estivo-autunnale del 1905 si constatò che l'assidua ed energica azione antimalarica potè dove proseguire e dove iniziare il bonificamento dei territori pure i più malarici.

***

Nelle mie precedenti relazioni ho insistito sullo studio dei *vari indici misuratori dell'intensità epidemica.*

Or bene agli altri indici da me già rilevati (perniciosità e recidività delle febbri, rapporto fra le febbri gravi e le miti, percentuale di tutti gli abitanti e rispettivamente dei bambini infetti) i fratelli Sergent (1) aggiunsero la percentuale del tumore di milza fra gli abitanti.

Così rimane sempre più confermato che parecchi sono gli indici epidemici dei quali si deve seguire il movimento per conoscere con esattezza le annuali variazioni dell'epidemie di malaria.

2. — Etiologia e distribuzione geografica dei parassiti malarici.

M. Levi Della Vida ha studiato a fondo il *Plasmodium quartanae* finora il meno bene conosciuto, e cogli ultimi perfezionamenti di tecnica (metodi di colorazione secondo Giemsa e Marino) ha potuto

(1) *La malaria en Portugal. Premiers résultats d'une enquête.* Lisbonne, 1900.

dimostrare che, se fra le varie forme dei parassiti malarici corrispondenti ai tre tipi febbrili vi sono differenze tali che agevolmente permettono una diagnosi fra di essi, purtuttavia i fenomeni che si compiono durante il ciclo nell'uomo sono essenzialmente gli stessi, anche nelle più minute particolarità.

Difatti il processo di proliferazione nucleare, la schizogonia, la struttura dei gameti maschili e femminili, corrispondono nel plasmodio della quartana perfettamente a quanto ha descritto lo Schaudinn nella terzana lieve. Anche lo scoloramento dei globuli rossi che albergano i gameti ha un riscontro con ciò che avviene nella terzana grave. E così nelle particolarità di struttura più che nell'aspetto generale del parasita, riscontransi note identiche nel *Plasmodium quartanae,* nel *vivax* e nel *praecox;* e sempre più si viene alla persuasione che questi parassiti, *piuttosto che specie diverse di uno stesso genere siano varietà di una sola specie,* come ebbi già a sostenere sino dal 1891 (1).

A sua volta per l'anno scorso, la seguente

TABELLA I.

LOCALITA'	Terzana grave		Terzana lieve		Quartana		Proporzione della terzana grave e lieve
	Totale	%	Totale	%	Totale	%	
Provincia di Alessandria	2	0.99	164	81.18	36	17.82	1:82.00
Vercellese.	7	5.30	124	93.93	1	0.75	1:17.71
Veronese (Vigasio) . . .	93	25.00	215	57.79	64	17.20	1: 2.31
Agro Romano.	67	85.89	7	8.97	4	5.12	1: 0.10
Capitanata (Bovino) . .	181	67.79	32	30.71	4	1.49	1: 0.17
Basilicata (Atella) . . .	60	60.00	25	25.00	15	15.00	1: 0.41
Sicilia (Catania)	120	60.00	50	25.00	30	15.00	1: 0.41
Sardegna	1584	65.30	724	29.66	133	5.45	1: 0.46
Ungheria (*a*)	519	29.68	1027	53.02	202	11.55	1: 1.98
Russia (*b*)	..	22–44	..	72–140	..	3-7	..

(*a*) Osservazioni fatte dal 1888 al 1904 a Kolozsvár.
(*b*) Le percentuali si riferiscono alle sole febbri recidive.

(1) *Transactions of the seventh international Congress of Hygiene, ecc.* London, 1891. Vol. II, Section II, Bacteriology.

conferma la già ben nota distribuzione geografica dei parassiti delle terzane grave e lieve, per cui ne risultano le due ben note Italie malariche, la superiore con malaria lieve la inferiore con malaria grave.

L'alta proporzione di malaria grave dal Lazio in giù conferma la corrispondente intensità dell'annata epidemica scorsa.

La malaria di Ungheria si avvicina per la rispettiva proporzione dei parassiti a quella nostra del Veronese.

La malaria di Russia è nel suo insieme assai meno grave della nostra meridionale e insulare.

L'Italia ha quindi in Europa il triste primato della malaria.

La quartana è sempre quella che ha la più irregolare distribuzione geografica.

3. — Recidività delle febbri da malaria. Infezione latente.

Sempre allo scopo di conoscere un *mezzo diagnostico della malaria latente* il Casagrandi e il De Blasi ognuno da un diverso punto di vista hanno studiato i processi di emolisi nell'infezione malarica dell'uomo e degli animali. Dalle loro ricerche intanto risulta che nel siero dei malarici non sono direttamente dimostrabili sostanze emolitiche, ciò che era già stato accertato da Celli, Casagrandi e Carducci (1).

Le ricerche del Casagrandi hanno provato che dal sangue dei terzanari si estraggono coi solventi dei grassi, certe sostanze auto-iso ed eteroemolitiche, in maggior quantità durante l'acme, in minime quantità all'inizio della elevazione termica: queste emolisine sono coctostabili, del tipo di quelle riscontrate nella milza da Korschun e Morgenroth e da altri autori nel sangue di vari animali. Quantunque l' A. non le abbia trovate nel sangue di persone sane si astiene dall'attribuir loro un significato specifico.

Il De Blasi invece nel semplice estratto acquoso della parte corpuscolata tanto nel sangue dei malarici in atto (estivo-autunnali, terzanari lievi e quartanari) durante il periodo febbrile e l'apiretico, quanto in quello dei convalescenti di malaria ha dimostrato delle emolisine, con azione principalmente autolitica, non coctostabili, ma resistenti al calore più delle ordinarie emolisine. Nell' estratto acquoso del sangue sano tali emolisine non si rinvengono, ma si possono dimo-

(1) Questi Annali, vol. XIII e XIV, 1902 e 1903.

strare in altre infezioni o batteriche, come nel tifo, o d'origine ancora non accertata come nel morbillo e nella scarlattina. Non sono dunque specifiche, e quindi non pare possano servire a scopo diagnostico; ma la dimostrazione di esse porta una conferma sperimentale all'ipotesi di Marchiafava e Bignami, che nel sangue dei malarici una parte dei corpuscoli si comporta verso gli altri come se fossero eterogenei.

Bisogna quindi *battere ancora la via sperimentale, e specialmente quella parallela della pirosomiasi e tripanosomiosi, prima che per la malaria dell'uomo si possa dall'esame del sangue ricavare un metodo diagnostico della infezione latente.*

Quanto alla *durata della latenza dell' infezione malarica*, il Mircoli (1) descrive casi di scoppio di un primo accesso fino a 3 anni dopo la partenza dalla zona malarica.

Rimane però il dubbio se non si trattasse di recidiva, susseguente cioè ad accessi tanto lievi da sfuggire alla osservazione.

Lo stesso A. descrive altresì alcuni casi di recidive a lunghissimo intervallo, perfino di 15 e più anni, dopo la continua dimora in zona salubre.

***

Dobbiamo al dott. Polettini (Vigasio) osservazioni, secondo il solito, molto accurate sulla *recidività nei luoghi ed anni di mite epidemia:* in questi casi cioè manca la recrudescenza preepidemica; la percentuale della recidività viene ad essere nelle diverse età presso a poco uguale; e insieme col decorso clinico mite è massima la sensibilità verso il chinino.

La terzana lieve e la quartana si mantengono però sempre le più ostinate nel recidivare.

E per quanto d'altra parte sappiamo che avviene in anni e luoghi di malaria grave si conferma che la *recidività è una delle cause prime che regolano le variazioni annuali e locali delle epidemie.*

Onde la urgenza di poterla, per quanto è possibile, prevenire e infrenare coi mezzi migliori di trattamento specifico, preventivo e curativo.

In questo senso ogni perfezionamento nella preparazione del chinino, rendendolo aggradevole in specie ai bambini, diventa un' indispensabile arma di lotta contro la epidemia.

---

(1) *Clinica Medica*, n. 7, 1905. Milano.

Risulta pure che oltre a cause generali, che ancora ci sfuggono, anche certe cause individuali (forse organiche?) influiscono sulla recidività, che in alcuni casi si mantiene ostinatamente ribelle a qualsiasi genere di cura, eziandio in luoghi ed anni di malaria mite.

4. — Decorso annuale delle febbri recidive e primitive. Tipi epidemici.

Il dott. Jancsò, nell'Ungheria ha potuto confermare le leggi da me trovate in Italia.

Difatti, discernendo il più accuratamente possibile i casi primitivi da quelli recidivi delle 3 specie di parassiti malarici, potè dimostrare che le recidive non solo collegano gli anni epidemici fra loro, ma in particolare eziandio gli anni epidemici delle 3 diverse forme parasitarie.

E così anche in Ungheria la terzana lieve dà una epidemia primaverile-estiva, la terzana grave ne dà una estivo-autunnale e la quartana una autunnale. E, nel suo complesso, l'anno epidemico ungherese è una varietà del nostro tipo Nord-Italia (1); dal quale si differenzia soltanto perchè un primo massimo coincide col maggio, e, dopo una lieve recrudescenza ai principî dell'estate, un secondo e più elevato massimo coincide in agosto e settembre.

Analogamente avviene in Russia, con la differenza però che il primo massimo nel maggio, dovuto quasi esclusivamente alla recrudescenza preepidemica della terzana lieve, si mantiene più alto del secondo massimo che coincide nel luglio, quando comincia la terzana grave, che poi continua nell'agosto.

È importante rilevare che questo principio dell' epidemia di terzana grave coincide così nelle nostre regioni più calde come in Russia e in Ungheria. Quindi non dipende *sic et simpliciter* dalla temperatura ambiente.

Lo stesso dicasi per la nuova epidemia delle altre febbri malariche.

Nell'anno scorso cominciammo ad avere notizie sui *tipi epidemici predominanti nelle nostre grandi isole.*

Per quanto le ricerche finora fatte sieno incomplete, si può intravedere che in Sicilia, nella zona littoranea di Catania-Siracusa si ha il tipo epidemico Sud-Italia (2), mentre nell' interno predominerebbe, almeno nella zona mineraria solfurea, la terzana lieve.

---

(1) V. questi Annali, vol. XIII, 1902.
(2) V. questi Annali, vol. XIII, 1902.

Una simile differenza risultò già per la Sardegna, ove nella stessa provincia di Cagliari all'estremo Nord predomina il tipo epidemico Sud-Italia, e all'estremo Sud invece il tipo epidemico Nord-Italia, fino al punto che in un sobborgo della città di Cagliari si ha un focolaio di malaria lieve, all'inverso di quanto vedemmo nella città di Mantova (1) dove cioè predominava la malaria grave in mezzo a una provincia caratterizzata da una malaria mite.

6. — Vita delle zanzare in rapporto con l'epidemia di malaria.

Anche nell'Ungheria, come nel Nord Europa e nel Nord Italia l'anofelismo è rimasto ad onta della progressiva e marcatissima attenuazione della epidemia di malaria.

In Italia poi nuove zone di anofelismo senza più affatto malaria vennero incontrate non soltanto lungo il litorale ligure (Albenga) ma ciò che più interessa, anche in una regione meridionale, qual'è il bacino inferiore del Sarno, proprio verso il litorale fra Torre Annunziata e Castellammare di Stabia.

Cosicchè il *fausto evento dell'anofelismo senza malaria può accadere anche in mezzo ad un clima caldo*, il che torna di ottimo augurio per tutte le nostre plaghe continentali e insulari di malaria più grave.

Nell'Algeria (fratelli Sergent) e più estesamente ancora nelle Indie olandesi (dott. De Vogel) (2) fu osservato che le zanzare anofele possono compiere la loro vita acquatile anche entro stagni salati, dal 2.8 al 7.58 % di cloruro di sodio.

Nell'Algeria le stesse larve di *Anopheles maculipennis* — specie essenzialmente mediterranea — furon trovate in gran numero entro un'acqua con gm. 4.18 di NaCl per litro. Nelle Indie olandesi le larve che possono vivere anche nell'acqua marina svaporatasi, pel calore solare, fino alla concentrazione di $^1/_3$ e di $^1/_2$, appartengono all'*Anopheles vagus* (molto vicina se non la stessa della *Myzomia Rossi*). e ad altre specie somigliantissime alle *maculipennis*.

In certe condizioni alcune delle suddette larve adulte potrebbero sopportare anche il brusco passaggio dall'acqua dolce a quella salata.

Quindi *alcune specie di anofele possono benissimo compiere il loro sviluppo da uova ad imagine in acqua di mare eziandio concentrata.*

---

(1) V. Atti della Società per gli studi della Malaria, vol. IV, 1903.

(2) Un'interessante memoria del dott. De Vogel su questo argomento giunse troppo tardi per poterla pubblicare nel volume VII degli Atti citati. La riassumiamo perciò nei suoi punti principali.

Occorre quindi verificare se contrariamente alle osservazioni di Ficalbi, mie e di altri nostri soci, anche lungo il nostro litorale può avvenire qualcosa di simile, nel qual caso bisognerebbe abbandonare la speranza di risanare le paludi con acqua marina.

A sua volta nell'Ungheria il dott. Jancsò ha osservato che *le nuove generazioni di culex precedono quelle di anopheles*: queste compaiono alla fine e quelle invece al principio di aprile.

Finora così in Sicilia, come in Sardegna, vennero riscontrate le medesime specie di anofeli che nel nostro continente: la vicinanza però e i continui rapporti di comunicazione col litorale africano (Tunisi, Tripoli, Algeria) consigliano di insistere nelle ricerche di qualche altra specie.

Infine tanto nella Svizzera (Galli-Valerio e Rochaz-De-Jongh) quanto nella Russia possiamo esser certi che le uova anche di anofeli nell'acqua e in terreno appena umido svernano e resistono perfino a — 17° e — 18° C.

7. — **Rapporto tra le infezioni degli anofeli e l'epidemia di malaria.**

Da noi non si fecero — e sarebbero urgenti — nuove ricerche sulle infezioni degli anofeli. Solo il dott. Polettini ebbe ad osservare che il contagio domestico e quindi le ben note epidemie famigliari vengono a mancare in annate di lieve epidemia.

Fuori d'Italia, il dott. Jancsò dalle sue ricerche sperimentali deduce che quanto a bisogno di calore per lo sviluppo degli sporozoiti non c'è differenza fra le tre forme di plasmodi della malaria; anche sotto i 16° C. sebbene più lentamente, si svilupperebbero; quindi i primi casi di nuove infezioni primaverili sarebbero dovuti a quelli anofeli che d'inverno, dentro le case, succhiano sangue infetto, ovvero a quelli che ibernano dopo essersi infettati in autunno.

Egli però non ammette, oltre alle recidive, nessun altro anello di congiunzione dell'epidemia anno per anno.

Ma su questo argomento però occorrono ricerche ulteriori.

Secondo lo stesso autore le forme parasitarie nello stomaco delle zanzare non si possono differenziare che nei primissimi giorni di sviluppo.

Come però si distinguono per il loro ciclo di sviluppo nel sangue dell'uomo su tutta la superficie terrestre, così anche nello stomaco delle zanzare si svilupperebbero regolarmente in certe date epoche fisse, ma diverse per ognuna delle forme, in qualsiasi latitudine.

Quindi *la causa delle relative epidemie stagionali sarebbe essenzialmente dovuta a proprietà biologiche piuttosto che a ragioni climatiche.*

8. — Agricoltura e malaria.

Quanto ai *rapporti fra risaia e malaria* è notevole che il dott. Orta (Ferrarese) dopo vari anni di accurate osservazioni arriva a concludere che *la risaia non costituisce una ragione locale, più particolarmente favorevole alla genesi della malaria, in un territorio già necessariamente e di per sè palustre.*

Egli perciò con rammarico vede scemare questa coltura che procura alla mano d'opera tanto lavoro nel periodo in cui altri raccolti non ne domandano.

Lo stesso A. con ricerche sperimentali sostiene che la *dermatosi delle gambe delle risaiole* non è specifica della monda del riso, ma è dovuta alla azione irritante prolungata delle erbe *vive o sommerse (Carex, Potamogetum,* ecc.) nell'acqua riscaldata dal sole. Difatti in ambiente palustre analogo a quello della monda si può artificialmente con le dette erbe riprodurre la stessa dermatosi.

Sarebbero cause predisponenti la durata della sommersione, la fatica, il sudore.

Non esiste alcun germe specifico.

Assai importante è che pure nel bacino inferiore del Sarno vegetano rigogliose *risaie senza malaria.*

In questa medesima località prosperano le più belle colture irrigue e le carciofaie perenni uniche nel loro genere.

Nel Leccese con la diffusione della coltura del tabacco Erzegovina si comincia a notare un miglioramento nella epidemia di malaria.

E così nelle Puglie, come in Sicilia è manifesta l'influenza benefica antimalarica della coltura della vigna. Questa corregge ed elimina il paludismo, oltrechè adduce un beneficio economico (1).

Specialmente in Sicilia si citano contrade ove fu minima la malaria finchè la fillossera non distrusse i vigneti, ridiventò massima quando questi tornarono a prato o a sementa, e poi si risanarono con la generale ricostituzione della vigna.

Infine si è confermato che le foglie delle barbabietole offrono il più gradito rifugio alle zanzare alate.

---

(1) Notisi che nel nostro Mezzogiorno e in Sicilia di vino se ne beve di meno ove se ne produce di più. Quindi si può escludere ogni eventuale azione benefica dell'alcool.

9. — Altre cause predisponenti o non all'epidemia di malaria.

Quanto ai *rapporti fra climatologia e malaria* deve essere rilevato che ad onta delle eccessive pioggie primaverili, che furono seguite da inondazioni e persistenti paludismi, nell'Italia superiore e più specialmente nel Veneto e nell'Emilia, si mantenne eccezionalmente mite la epidemia; e neppure il caldo eccessivo ed afoso con cui si aprì l'estate scorsa, ebbe a riattivarla.

Così alta temperatura si mantenne dall'ultima settimana di giugno a tutto il luglio; e nondimeno solo a Candia Lomellina l'epidemia insorse con tale vivacità da lasciar temere — ciò che non avvenne — una delle annate più tristi per malaria.

Neanche il clima, quasi tropicale, di Catania, con sole 2 stagioni, estiva da maggio ad ottobre, primaverile da novembre ad aprile, riesce a modificare il tipo epidemico, che ivi si mantiene come quello del Lazio.

Tanto nella Sardegna quanto nell'Ungheria le variazioni epidemiche annuali non sono spiegabili con le vicende meteorologiche.

Il *terremoto delle Calabrie* (8 settembre) agì fortemente predisponendo all'epidemia.

Difatti poco dopo quella sciagura si notò un aumento di febbri che debbono considerarsi in gran parte come recidive, dato il breve tempo in cui comparvero niente affatto in rapporto con la durata del periodo di incubazione. La violenta emozione e il raffreddamento, pel dormire all'aperto, devono avere destata la recidività; quest'ultima condizione, il difetto cioè della casa, deve poi aver contribuito anche all'aumento delle infezioni primitive.

Così il terremoto fu causa di recrudescenze di epidemia di malaria tanto nella popolazione civile quanto nella popolazione militare accorsa sui luoghi del disastro tellurico.

I *rapporti fra industria e malaria* vennero indagati per le miniere di Sardegna, ove si constatò che sia per la recidività, sia pel numero di infezioni gravi, *la malaria nella popolazione mineraria decorre più intensa che nella popolazione agricola* del medesimo distretto.

Quanto ai *rapporti fra condizioni economiche ed epidemia di malaria* si notò che dove la malaria fu mite ne furono risparmiati anche i contadini addetti ai lavori più faticosi.

Fra questi lavori agricoli e l'andamento dell'epidemia si è ancora notata una correlazione intima in Sicilia, ove l'anno epidemico è ad unico massimo nelle regioni a coltura di solo grano, ed invece è come

bipartito, cioè ha due massimi fra loro distinti, nelle regioni di coltura mista di grano e vigna, grano e granturco, grano e riso.

Nell'Ungheria, però, osservando che così nei contadini come nelle truppe domina il medesimo tipo epidemico, si volle attenuare questa causa predisponente da noi ricercata nella vita e nei raccolti dei campi.

Infine anche altre condizioni economiche, quali alimentazione povera o deficiente, abitazione mancante o insufficiente si adducono da varii nostri soci quali cause predisponenti alle gravi epidemie nel Mezzogiorno; ma anche qui però si osservano qua e là quelle terribili pandemie che non si spiegano con le sole condizioni economiche, certo disagiate, ma non differenti da altre località che vengono molto meno colpite dalle febbri.

10. — Conclusioni epidemiologiche.

L'annata epidemica del 1905 fu, in generale, eccezionalmente lieve in tutta l'Italia superiore e in buona parte dell'Italia centrale. Invece nel Lazio e nel Mezzogiorno continentale, di regola, si mantenne grave; mentre nelle Isole in complesso non fu delle più gravi.

Dai confronti internazionali e da tutti gli indici epidemici risultò ancora una volta che l'Italia ha, in Europa, il triste primato della malaria, e questa è in alcuni luoghi del Mezzogiorno la più grave che si conosca alla superficie della terra.

I varii parasiti delle varie forme febbrili d'infezione malarica più che diverse specie d'uno stesso genere, sarebbero varietà di una sola specie.

Per quanto siasi continuato nelle ricerche coll'esame del sangue non fu potuto rinvenire un metodo diagnostico della infezione latente e recidivante.

Resta però ben assodato che la recidività è una delle cause prime che regolano le variazioni annue e locali dell'epidemia di malaria.

I tipi epidemici quali furono osservati in Italia si riscontrano identici anche nell'Ungheria e nella Russia.

Quindi, la causa delle epidemie stagionali sarebbe più che a ragioni climatiche dovuta a proprietà biologiche inerenti ai rispettivi parasiti della malaria, tanto più che anche il fausto evento dell'anofelismo senza malaria può accadere eziandio in mezzo a un clima caldo, come nel nostro Mezzogiorno.

Si è pure confermato che la risaia in un territorio palustre non costituisce una ragion locale più particolarmente favorevole alla ge-

nesi della malaria; e risaie senza malaria s'incontrarono eziandio nel Mezzogiorno.

Sempre più dubbi ed oscuri apparvero i rapporti fra metereologia e malaria e specialmente fra questa e le pioggie coi susseguenti paludismi.

Il terremoto delle Calabrie fu senza dubbio una causa predisponente alla epidemia.

Fra i minatori di Sardegna si riscontrò un'epidemia più intensa che nella corrispondente popolazione agricola.

E infine i rapporti fra le condizioni economiche e l'epidemia, per quanto sempre indiscutibili, non furono trovati sufficienti a spiegare le ragioni di quelle terribili pandemie locali che sono una vera e grande calamità pubblica nel Mezzogiorno.

Cosicchè ancora ulteriori studi occorrono per illuminare con la luce delle nuove ricerche etiologiche la epidemiologia della malaria.

PARTE II.

Profilassi della malaria.

Nel decorso anno 1905 fummo occupati a studiare la cura radicale delle febbri recidive, a diffondere la profilassi specialmente chininica, e a vedere la portata sia della distruzione delle zanzare, sia delle bonifiche idrauliche e agrarie nel risanamento d'un territorio dalla malaria.

Riferirò prima i risultati ottenuti, e poi ne ricaverò qualche criterio per la organizzazione della guerra alla malaria.

A. — Chinino di Stato.

Il progresso di questa nostra provvida istituzione viene dimostrato dal consumo sempre ascendente del prezioso farmaco, il quale nelle sue varie forme (tavolette, confetti, fiale sterilizzate) da chili 2242, nel primo anno finanziario 1902-1903, salì a 7234 nel secondo anno, a 14,071 nel terzo, e superò i 18,000 in quest'anno 1905-1906.

I pregi oramai indiscutibili del grande rimedio di Stato, appena vengono conosciuti, abbattono ogni diffidenza ed ogni ostacolo che l'industrialismo tentò e tenta opporre alla marcia trionfale d'una istituzione ormai benedetta da tutta la nostra gente rurale.

Che si diffonda ovunque, in ogni angolo del nostro territorio, è questione di tempo e di organizzazione.

***

Nell'esercizio finanziario 1904-1905 la diffusione del chinino di Stato (1), secondo le regioni fu come nella seguente

TABELLA 2.

REGIONI	Consumo totale in chili	Consumo per abitante in grammi
Piemonte	834.822	0.249
Liguria	21.863	0.019
Lombardia	1,556.517	0.356
Veneto	1,162.253	0.365
Emilia	622.453	0.251
Toscana	287.702	0.110
Marche	12.748	0.011
Umbria	28.190	0.041
Lazio	1,049.855	0.851
Abruzzi e Molise	561.220	0.384
Campania	1,007.712	0.315
Puglie	2,313.248	1.146
Basilicata	698.385	1.423
Calabrie	969.630	0.699
Sicilia	1,759.317	0.486
Sardegna	1,171.795	0.451
Totale	14,061.212	0.425

Sicchè le regioni che consumarono più chinino di Stato, in ordine decrescente, furono le Puglie, la Sicilia, la Lombardia, la Sardegna, il Veneto, il Lazio, la Campania; ma in rapporto ad ogni abitante furono la Basilicata, le Puglie, il Lazio, le Calabrie e poi la Sicilia e la Sardegna.

Riportando il massimo consumo per abitante di singole provincie si ha per Foggia gr. 2.6; per Sassari gr. 1.9; per Potenza gr. 1.4; per Cagliari gr. 1.1; per Cosenza gr. 1.06; per Rovigo gr. 1.05; per Lecce gr. 0.9; per il Lazio gr. 0.8. Notisi che il solo comune di Roma ne consumò più di 300 chili.

Le cifre sopraesposte, ci dicono però che, *tenuto conto del bisogno, siamo ancora all'inizio del consumo di chinino di Stato.*

E notisi pure che l'industria privata continua presso a poco come prima nel commercio del chinino (2).

Il che dimostra come *il chinino dello Stato arriva a quella parte di popolazione che per essere la più misera, non avea prima i mezzi di acquistarlo.*

E così la nostra legislazione antimalarica tende sempre più a raggiungere il suo vero scopo altamente sociale.

---

(1) Relazione del comm. Sandri sull'azienda del chinino di Stato dal 1° luglio 1904 al 30 giugno 1905. Roma, 1906.

(2) V. Relazione predetta a pag. 15.

È più che mai *urgente la necessità di mettere in commercio un chinino di Stato non amaro, ad uso specialmente dei bambini.*

I cioccolatini di tannato di chinino, preparati ammirevolmente dalla nostra Fabbrica di chinino di Stato, secondo il parere (1) del Consiglio superiore di Sanità, se raggiungevano lo scopo della insipidità avrebbero perduta quasi tutta l'efficacia dell'alcaloide.

A controllare questa asserzione furono diretti gli studi sperimentali dal prof. Cervello (Palermo) e del prof. Gaglio (Roma), nonchè le osservazioni cliniche di molti pediatri e medici malariologi in Italia e all'estero.

Il prof. Cervello, che più specialmente ha rivolto le sue ricerche alla parte galenica della questione, dopo aver dimostrato che il pochissimo grasso residuale del cacao, previamente sgrassato, non ostacola l' assorbimento del tannato, e non è causa di alterabilità dei cioccolatini, conclude che questi non sono da rigettarsi; anzi nella campagna antimalarica possono rendere grandi servizi alla terapia dei bambini.

Il prof. Gaglio continuando, col dott. Flamini, le esperienze sull'assorbimento del tannato di chinina, iniziate già dal dott. Modigliani (2), dimostra che questo sale si scompone per opera specialmente della bile, e così viene ad assorbirsi nella sua massima parte; esso poi è ben tollerato dal canale alimentare e dai centri nervosi.

La lentezza con cui si assorbe può riuscire in particolar modo utile, quando occorra di mantenere l'organismo per un lungo tempo sotto l'azione della chinina, e quindi *più in ispecie quando si ha da fare con la malaria cronica ovvero con le cure profilattiche.*

E d'altra parte considerando che i terapisti in coro indicano questo preparato come particolarmente adatto nella pratica medica infantile, egli conclude che i cioccolatini di tannato trovano il loro posto accanto ai confetti di chinina e alle fialette per l'iniezioni ipodermiche: gradevoli alla vista e e al gusto, destinati particolarmente ai bambini, contribuiranno a rendere la benefica opera dello Stato meglio accetta e più efficace.

A sua volta il dott. Flamini, dopo avere sotto la sapiente guida del professor Gaglio sottoposto all'analisi sperimentale l'assorbimento del tannato di chinina nei bambini, formola le conclusioni seguenti:

Il tannato di chinina si assorbe quasi completamente a traverso il tubo gastro-intestinale. Il suo assorbimento però dura più a lungo di quello di altri sali più solubili. La sua eliminazione per le urine dura quasi tre giorni e si compie in buona parte nelle prime 24 ore.

L'assorbimento del tannato di chinina in cioccolatini dura un po' più a lungo di quello in polvere (come si può dedurre dai dosaggi fatti sulle orine). Ad ogni modo, tanto l'uno che l'altro si assorbono quasi completamente (come si può dedurre dai dosaggi sulle feci).

---

(1) Corriere Sanitario, anno XVI, n. 44, 4 giugno 1905.
(2) Atti della Società per gli studi della Malaria, vol. VI, 1905.

Il tannato di chinina, per il suo prolungato assorbimento, esplica sull'organismo un effetto che qualche volta può essere più utile di un sale a rapido assorbimento, perchè lascia l'economia sotto l'influenza più persistente della chinina.

L'assorbimento del tannato di chinina nello stomaco è poco notevole a causa principalmente della scarsa azione che possono su di esso avere l'HCl e gli altri acidi del succo gastrico.

La bile, principalmente con i suoi acidi organici, ed il succo pancreatico principalmente, con le sue potenti basi, hanno un'azione notevole sull'assorbimento di questo sale.

Anche il succo intestinale, per la sua alcalinità, deve avere una certa azione, quantunque minore di quella del succo pancreatico. L'assorbimento del tannato di chinina a traverso il retto è minimo.

Oltre di chè, il dott. Flamini nella scuola pediatrica di Roma ha studiato clinicamente in 17 casi l'uso terapeutico dei cioccolatini; e ha poi raccolto le storie cliniche di altri 339 casi osservati da vari medici d'Italia, nonchè 252 casi nei quali l'uso dei cioccolatini fu a scopo profilattico; e dalle sue e dalle altre concordi osservazioni deduce che:

Il tannato di chinina è un preparato che corrisponde molto bene nella cura della malaria e che per il suo sapore poco amaro è utile in ispecie nella pratica infantile. Esso riesce a troncare gli accessi febbrili con la stessa prontezza di altri preparati di chinina, purchè ingerito, nei primi due o tre giorni di cura, a dosi un po' elevate.

Per il suo prolungato assorbimento riesce in particolar modo utile nella profilassi.

Raramente provoca disturbi gastrici od intestinali: anzi spesso riesce a guarire quei disturbi delle vie digerenti che a volte si accompagnano alla malaria, specialmente nei bambini.

La formula dei cioccolatini di chinina dello Stato è poi utilissima nella cura e profilassi della malaria infantile, perchè costituisce un preparato che viene preso molto volentieri, anzi, spesso avidamente dai piccoli pazienti.

Il dott. Cagiati, medico-capo del grande ospedale infantile, Bambin Gesù, in Roma, il dott. Mazzitelli nei bambini dell'ospedale di S. Spirito, il dott. Orta di Argenta, il dott. Omodei-Zorini di Candia Lomellina, arrivano unanimi alle stesse conclusioni (1).

In tutto furono 375 i bambini egregiamente curati, e 352 i bambini egregiamente profilassati coi cioccolatini di chinino di Stato nella stagione malarica scorsa.

Quindi *è ormai fuori ogni dubbio che il tannato di chinina si assorbe assai bene, ed anzi la lentezza con cui si assorbe è più indicata per meglio prevenire le infezioni primitive e recidive.*

Come è certo che tutti quanti, medici e piccoli clienti, ebbero a

(1) Anche i fratelli Sergent (Algeria) assicurano che: les chocolatines au tannate de quinine, que nous avons reçues du prof. Celli de Rome, sont fort bien acceptées des jeunes enfants. V. Annales de l'Institut Pasteur, loc. cit.

provare i cioccolattini di tannato di chinino dello Stato, ne rimasero entusiasti (1).

E la sezione romana della Società Italiana di Pediatria, nella sua ultima seduta del 9 aprile p. p. (2) sanzionò autorevolmente che *sono il rimedio migliore nella pratica pediatrica contro la malaria.*

Quindi ora si può credere e sperare che, dopo così unanime e autorevole plebiscito sperimentale e clinico, il Consiglio superiore di sanità ne suffraghi la preparazione e la messa in vendita per l'imminente campagna antimalarica.

***

Mentre si sta perfezionando, per le iniezioni ipodermiche, la formula del prof. Gaglio (idroclorato con etiluretano), dal primo luglio p. v. le fiale sterilizzate di bicloruro di chinino saranno poste in vendita anche negli spacci di sale e tabacco, e così potranno arrivare in ogni angolo del nostro territorio più malarico.

Ai confetti di bisolfato e cloridrato furono aggiunti quelli di bicloridrato. Ed aggiungendosi ora anche il tannato nella sua ottima forma dei cioccolatini avremo tutte le preparazioni da poter scegliere, caso per caso, nella grande pratica profilattica e terapeutica antimalarica.

B. — Cura radicale delle febbri recidive.

Di questo essenziale problema seguitarono ad occuparsi energicamente varii autori nostri e stranieri.

Unanime è ormai il consenso che *la chinina pur essendo un rimedio sovrano contro la infezione malarica, purtuttavia non riesce ad estirpare certe recidive*, nemmeno s'è presa alla dose di gr. 1–1.50 al giorno per mesi di seguito, o è aggiunta all'arsenico e al ferro, somministrati anche insieme o separatamente, per bocca o per iniezioni ipodermiche.

Rari però sono per fortuna i casi nei quali la chinina già non agisce o agisce poco nel troncar la febbre; ma non rari sono i casi nei quali non riesce a estirpare in breve tempo la infezione latente.

---

(1) Il dr. Mazzitelli trovò anche negli adulti i cioccolattini particolarmente utili per prevenire, il più possibile, la recidività.

(2) *Rivista di Clinica pediatrica*, 1906, fasc. 5.

Quindi un rapido mezzo di cura radicale delle recidive non esiste. L'essenziale è l'evitarle, col prevenire più che si può le infezioni primitive, e, se ciò non riesce, il ridurle ai minimi termini possibili con la cura specifica più prolungata sia durante il periodo epidemico, sia durante il periodo interepidemico, e col chiamare in soccorso altri mezzi di resistenza organica (specialmente l'alimentazione).

P. es.: ad Argenta di 133 recidivi curati lungamente nel 1904 soli 8 recidivarono durante la stagione malarica del 1905.

Così pure a Vigasio di 259 malarici nel 1904, assiduamente curati, soltanto 17 recidivarono in estate ed autunno del 1905.

Nessun malariologo può, ad ogni modo, accettare la sentenza del Glogner (1) che cioè dopo troncate le febbri la chinina sia un rimedio superfluo, se non anche dannoso, e che in gran numero di malati il periodo febbrile, tra una recidiva e l'altra, sia più lungo senza che non con la cura chinacea.

E nemmeno si può accettare il consiglio del Tange (2), che cioè troncato l'accesso si sospenda l'uso del chinino, e metodicamente si faccia l'esame del sangue, ridando subito il rimedio appena si ripresentano i parassiti. A parte che ciò è possibile soltanto por un limitatissimo numero di malati, può accadere che l'accesso febbrile prima che il reperto del sangue riveli il ridestarsi dell' infezione latente.

Interessa anche scegliere il metodo migliore di cura radicale delle febbri e per poterla prolungare quanto occorre, somministrare il rimedio nella forma più aggradevole.

Il metodo di cura, com'è notorio, può essere discontinuo o continuo.

Il metodo discontinuo secondo Laveran consiste nel dare chinino per 3 giorni di seguito, e nel sospenderlo poi per gli altri 4 giorni della settimana, e così proseguire per 8 settimane, con dosi però decrescenti, cioè di gr. 1,50 al giorno nelle prime due settimane, gr. 1 per altre 3 settimane, gr. 0,75 per 2 settimane, e gr. 0,50 al giorno per l'ultima settimana.

Questo metodo però, oltrechè troppo complicato nella grande pratica di campagna, è tutt'altro che infallibile.

Nell'ospedale di S. Spirito il prof. Carducci ha messo in confronto il metodo discontinuo settimanale (Koch, ecc.) con quello continuo quotidiano (Celli). Egli constatò che per la terzana lieve è indifferente l'uno o l'altro metodo: per la terzana grave parrebbe preferibile il discontinuo; l'uno e l'altro però hanno i loro insuccessi.

Nè per impedire le recidive può valere il somministrare dosi forti (gr. 2-2,50 e perfino gr. 5 al giorno), nè frazionare come insiste il Nocht (3) in 5-6 volte nelle 24 ore la dose ordinaria di 1-2 grammi.

---

(1) Virchow's Archiv, vol. 166.
(2) Arch. für Schiffs — und Tropenhygiene, vol. X, fasc. 10, 1906.
(3) Verhandlungen des deutschen Kolonial Kongresses, 1905.

Certo poi è che nella pratica, specie di campagna, per contadini ed operai, si presta meglio ed è più accetto il metodo continuo con dosi terapeutiche (gr. 1-1.20) per 3-4 giorni dopo un accesso, e poi con dosi medie (gr. 0.40 - 0.60) per molti giorni di seguito.

Così la presa del rimedio è più facile e sicura.

L'essenziale poi è di continuare la cura per 2-3 mesi: qualche recidiva, che verrà, sarà per lo più lieve e d'anno in anno il loro numero scemerà progressivamente.

La messa in vendita dei cioccolatini di tannato al minimo prezzo (1) agevolerà senza dubbio anche negli adulti la cura delle febbri recidive.

C. — Cura preepidemica della malaria recidivante o latente.

Per le considerazioni che già svolsi nei miei precedenti rapporti (2) non abbiamo più proseguito per questa via, consigliando invece di crescere pei recidivi la dose profilattica dai 40 ai 60 centigrammi al giorno, almeno nel primo mese, e proponendo adottare i confetti di bicloridrato di chinina siccome quelli più ricchi di alcaloide e più facilmente assorbibili anche dagli stomachi più guasti dall' infezione palustre e dalla cattiva alimentazione.

D. — Profilassi medicamentosa o chininica.

Da noi è ormai divenuto un assioma che *la profilassi chininica con le dosi medie* (40 cgr.) *quotidiane e coi confetti di chinino dello Stato* è un potente mezzo di lotta contro la malaria, oltrechè riesce facile, semplice, di poca spesa ed innocuo.

Tuttavia alcuni si ostinano a continuare il metodo intermittente o settimanale (un gr. per sera il sabato e la domenica) ad onta che ogni volta rinnova i fenomeni di chinismo, e non è certo più efficace del metodo continuo.

Ad es. il dott. Morgenroth (3), nelle truppe coloniali tedesche, ha osservato in Africa che col metodo intermittente solo pochissimi non accusavano

(1) Questo prezzo è già fissato in ragione di cent. 8 al gr. di bisolfato di chinina. Questa sarà dunque a bassissimo prezzo; e il cioccolato sarà *gratis*.
(2) V. questi Annali, vol. XIII-XV, 1902-1905.
(3) Archiv. f. Schiffs, und Tropenhygiene, vol. X, n. 5, 1906.

alcun disturbo; altri ne soffrirono ogni volta per tutta la cura anche prendendo chinino la sera dopo il pasto e si dovette perciò scendere alla dose di ½ gr. per volta.

A causa poi anche dell'amaritudine con cui egli somministrava il chinino, in forma di tavolette o in altra forma disaggradevole, incontrò, ad onta della ferrea disciplina miltare, una resistenza vivace contro questo metodo profilattico, che non potè continuare fin dopo la fine della stagione delle febbri.

Invece il nostro metodo continuo, reso aggradevole con la somministrazione di confetti (1) o di cioccolatini di chinino, è ormai il solo pratico e accetto alle nostre popolazioni eziandio più incolte.

Anche il dott. Kermorgant (2) riconosce il metodo delle dosi medie quotidiane essere preferibile, anzi l'unico attuabile nella grande maggioranza dei casi; quindi in ogni paese malarico dovrebbe impiantarsi prima di ogni altro, salvo a combinarlo poi con altri metodi profilattici. E così pure la Lega Còrsa contro la malaria raccomanda la profilassi chininica per la sua efficacia, per la sua comodità, pel suo buon mercato (3).

Sono perciò convinto che anche in mezzo agli indigeni di regioni tropicali il nostro metodo incontrerebbe favore.

I primi campi dimostrativi della profilassi quotidiana (centgm. 30 al giorno) impiantati nell'Algeria dai fratelli Sergent, sebbene con modi poco aggradevoli di somministrazione, hanno già dato esiti favorevoli, controllati con l'esame metodico della milza, che diminuì nel 71.8 % dei profilassati, mentre ingrossò nel 69.5 % di controlli.

Però, la profilassi chininica, specialmente quotidiana, incontrò alcune *nuove obbiezioni*: cioè, impedirebbe lo stabilirsi della immunità consecutiva all'infezione sofferta; e con l'uso prolungato danneggierebbe lo sviluppo dell'intelligenza nei bambini.

Alla prima obbiezione è facile rispondere che a troppo caro prezzo si deve acquistare quel tal grado d'immunità che non è nemmeno certa a venire, nè stabile a rimanere.

Alla seconda obbiezione, gli insegnanti e i direttori didattici delle scuole rurali dell'Agro Romano (Ostia e Le Castella) e dello asilo d'infanzia di Candia Lomellina, rispondono che mantenendosi immuni da febbri, mediante il chinino, i ragazzi sono vispi e intelligenti più assai dei loro compagni che cadono malati.

---

(1) Dei nostri confetti di chinino di Stato i fratelli Sergent (loc. cit.) dicono: « Les enfants ont toujours préféré ces comprimés aux autres modes d'administration (poudre dans du papier à cigarettes) ».

(2) *Prophylaxie du paludisme*. Annales d'hygiène et de médicine coloniales, vol. 1°, 1906, Parigi.

(3) Notisi che in Corsica il chinino in polvere è ancora a 15 centesimi il grammo, mentre da noi quello in confetti è a 6 centesimi.

L'inconveniente di *qualche caso letale nei bambini*, per eccessiva ingestione dei confetti, potrà essere evitato con la vigilanza più assidua dei genitori, e con la disposizione ora adottata di abolire le scatole ripiene di troppi confetti, e questi distribuirli sempre, 10 per 10, entro tubetti di vetro. Quando poi, come speriamo, avremo i cioccolattini, poichè il tannato di chinino anche ad alte dosi non riesce tossico (1) (forse perchè se ne assorbe sol quanto i succhi digestivi e specialmente la bile, possono decomporne), potremo allora eliminare anche questo inconveniente, che è pur minimo vicino agli enormi benefizi che arreca il chinino di Stato.

La tabella 3 ci dice quale fu l'esito della profilassi chininica in quei soli *campi dimostrativi* dei quali avemmo più precise notizie dai nostri soci.

---

(1) Comunicazione orale del prof. Gaglio.

TABEL

Profilassi medicamentosa col chin

Luogo dove fu applicata la profilassi	Preparato usato	Dose giornaliera di chinino — Cgr.	Durata del trattamento — Mesi	Persone profilassate	Si ammalarono di recidive — Numero	%
Monferrato	Bisolfato in confetti	20 - 40	1 - 5	255	13	5.1
Stroppiana	Id.	20	4 - 5	375	..	..
Vercellese (Pezzana) . .	Id.	20	4 - 5	544	..	..
Lomellina (Candia e Langosco).	Id.	20 - 40	2 - 4	1200	26	2.1
Mortara.	Id.	20	1 - 2	713	..	..
Milano	Id.	20 - 40	4	5143	..	..
Veronese (Vigasio, Pontepossero).	Id.	20 - 40	4	677	4	0.5
Mantova	Id.	40	4	384	2	0.5
Modenese (Carpi)	Id.	40	4	262	..	..
Agro Romano.	Id.	40	5	38449	1251	3.2
Mezzogiorno (Puglie, Calabria).	Id.	40	1 - 5	7238	..	..
Sicilia.	Id.	40	4 - 5	1240	..	..
Sardegna	Id.	40	4 - 5	2405	321	8.4
Id.	Id.	40	4 - 5	103	91	15.[illegible]
Varie regioni d'Italia . .	Cioccolatini di tannato	15 - 30	1 - 5	352	11	10.[illegible]
		Totale nel 1905 . . .		**59,340**	..	..
		Id. nel 1904 . . .		**52,690**	..	..
		Id. nel 1903 . . .		**19,021**	..	..
		Id. nel 1902 . . .		**3,055**	..	..

II.

Stato in tutta Italia.

Si ammalarono di primitive		Si ammalarono in totalità		Controllo	Osservatori	Osservazioni
Numero	%	Numero	%	%		
..	..	13	5.1	61	Dottori Brignone e Alzona	
..	..	2	0.5	..	Dott. N. Vaccino	Ai bambini un confetto di chinino ogni due giorni.
..	..	4	0.7	2.5	Dott. A. Vaccino	Id. id.
4	0.3	30	2.5	..	Dottori Omodei-Zorini e Velasco	Id id.
..	..	..	..	..	Dott. Pezza	
..	..	158	3.0	..	Prof. Bordoni e dott. Bettinetti	
4	0.5	8	1.2	..	Dott. Polettini	
4	1.0	6	1.5	..	Dott. Soliani	
..	..	..	..	..	Dott. Tusini	
546	1.4	1797	4.6	..	Medici comunali, della Croce Rossa, della Società contro la malaria.	
..	..	1304	18.0	30 - 80	Varii medici ferroviari e comunali	
22	2.61	19	4.4	9.69	Croce Rossa e medici comunali	
34	5.3	..	..	..	Medici comunali, ecc.	
..	..	125	10.6	82.3	Dott. Repetto	Nei piani di Santa Lucia, in operai addetti alla bonifica.
..	..	11	..	..	Parecchi medici	
..	..	**3458**	**5.8**	..		
..	..	**4262**	**8.0**	..		
..	..	**932**	**5.6**	..		
..	..	**235**	**7.7**	..		

Sicchè su *59,340 profilassati si ebbero 3458 casi di malaria, cioè in tutto, fra recidivi e primitivi appena il 5.8 °/₀.*

Però molti e molti di più godettero il benefizio della profilassi chininica nella stagione malarica del 1905.

Per esempio, fu questo il mezzo più in uso nell' Italia superiore durante la monda del riso; e così dicasi nella Campania in settembre fra tutte le truppe delle grandi manovre, e lungo l' ex rete mediterranea, dal Lazio in giù in tutte le linee alle quali finora non fu potuta estendere la profilassi meccanica.

Anche fra le popolazioni rurali dobbiamo segnalare nella Campania più di 4000 casi profilassati, nell' Agro di Taranto altri 2400 circa, e nella sola provincia di Lecce quasi 50,000.

Cosicchè la *profilassi chininica quotidiana si è sempre più estesa nell' anno scorso, conquistando quel posto che in prima linea le spetta nella guerra alla malaria.*

Ormai per fortuna in ogni provincia anche più malarica d' Italia abbiamo potuto introdurre questa profilassi.

I risultati sono, naturalmente, varii nelle diverse regioni di malaria più o meno grave. S' intende che dove la recidività è più ostinata ivi si ha il maggior numero di insuccessi.

Questi però di regola si riducono a febbri miti che si troncano più facilmente, aumentando la dose del chinino, e spesso non impediscono nemmeno un moderato lavoro.

TABELLA IV.

Profilassi medicamentosa col chinino di Stato nel Mezzogiorno d'Italia.

LOCALITÀ	Profilassati	Si ammalarono		Controllo
		Numero	%	
Bova Marina. . .	34	7	20	35 %
Cotronese. . . .	1285	424	33	
Tarsia.	34	2	6	58 %
Rossano	1147	57	5	14 perniciose e molti casi.
Amendolara . . .	292	44	15	
Montalto Uffago. .	253	25	10	
Id. id. . .	810	158	30	Profilassi irregolare.
Casello	106	9	18	
Minervino e Scorano	120	6	5	
Cutrofiano. . . .	32	5	15	
Tuturano	287	89	31	Si scelsero le persone più soggette ad ammalarsi.
S. Vito Normanni .	198	7	4.5	
Pulsano	250	15	6	35 %
Agro tarantino . .	68	7	11	50 %
Taranto R. Marina.	1450	366	8.8	
Id. id. .	45	5	11	
Roseto Capospulico.	156	15	9	67 %
Bovino	114	16	14	80 %
Scanzano	70	22	30	
Atella.	337	10	2.9	
Montemilone . . .	150	15	1	Soli 75 giorni di lavoro perduti.
Totale. .	7238	1304	18.0	

La tabella 4 ci dice che pure nel mezzogiorno, dove è più grave la malaria, già nel primo anno di questa profilassi la morbosità è scesa dal 35-80 fino al 18 per cento.

Citiamo per esempio che ad Atella (Basilicata), cioè in uno dei più malarici luoghi del mondo in una popolazione operaia addetta ai lavori di una bonifica la morbosità per malaria fu del 2.9 per cento mentre la percentuale pandemica generale fu dell' 85 per cento.

A Roseto Capospulico (Calabria) mentre la morbosità generale per malaria fu del 67 per cento, fra i profilassati fu appena del 9 per cento.

Si ricordi però che a fine di stagione possono scoppiare le febbri appena sospesa la profilassi, e quindi questa dev' essere prolungata per almeno 2 settimane dopo che la temperatura massima diurna è stabilmente scesa al di sotto dei 20° C.

Si ricordi pure che ove più grave è la malaria ivi la dose profilattica giornaliera dev' essere più alta (3-4 confetti) e il preparato chinaceo dev' essere il bicloridrato a preferenza del bisolfato.

Nelle regioni invece di malaria mite la dose giornaliera può essere di soli 20 centgm. (1 confetto); e in quelle di malaria mitissima è bene seguire il savio consiglio del dott. Polettini, cioè di limitare questa profilassi a quei soli casolari dove e appena qualcuno ammali di febbre primitiva o recidiva durante la stagione epidemica.

E. — Profilassi meccanica.

La nuova Amministrazione delle ferrovie dello Stato ha già deciso di adottarla in tutta la rete mediterranea dal Lazio in giù, e di completarla, eziandio, per le zone più infette della rete Sicula.

Nel periodo di passaggio dall'esercizio privato a quello di Stato la profilassi meccanica è rimasta pressochè stazionaria; sappiamo però che tende ad essere sempre più imitata lungo le ferrovie, così come viene sempre più estesa a tutti gli operai che direttamente o indirettamente lavorano per conto dello Stato.

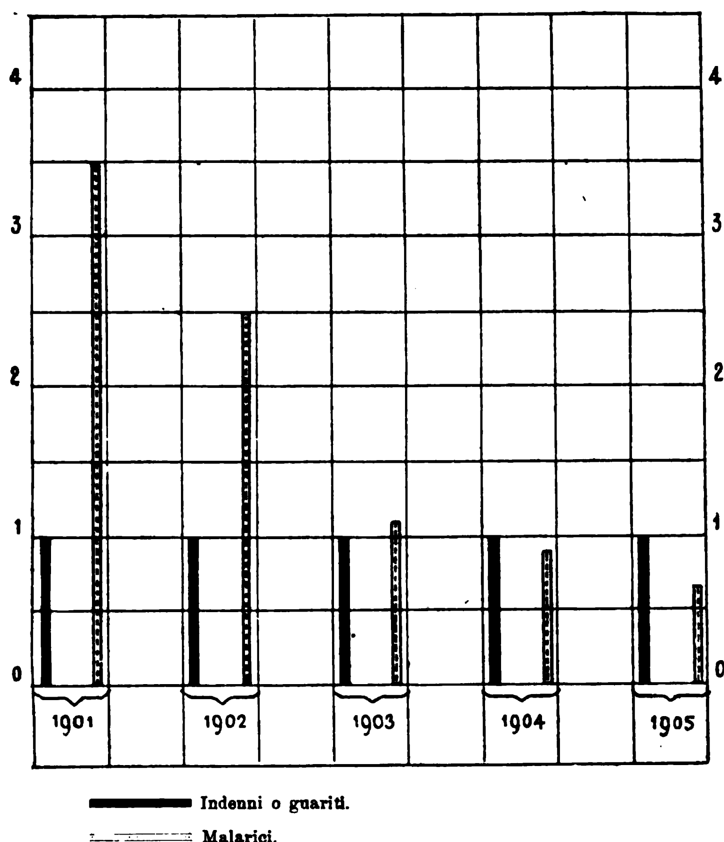
I benefici effetti di questa profilassi, che ormai è accolta dovunque, non hanno più bisogno di essere dimostrati.

F. — Profilassi mista (chimico-meccanica).

È ormai regolarmente in uso lungo le *ferrovie* o di Stato o private.

Ad esempio fu continuata nella rete delle Ferrovie Meridionali che percorrono zone tipicamente malariche, e come dimostra la figura 1, i risultati nel 1905 furono sempre progressivamente migliori.

Rapporti fra individui indenni o guariti ed individui malarici nelle linee protette nel quinquennio 1901-1905



La tabella 5, a sua volta, conferma che la percentuale dei casi è scesa ancora nel 1905 al 27.04, e la perdita delle giornate di malattia per ogni agente e per anno fu appena di 1.90.

TABELLA V.

Malaria lungo la Rete Adriatica e Meridionale.

	1888-1901	1902	1903	1904	1905
	Media				
Percentuale dei casi.	69.92	44.93	30.32	33.10	27.04
Giorni di durata media dei casi. .	7.88	6.99	6.25	7.15	7.02
Giornate di malattia perdute per ogni anno da ogni agente . . .	5.48	3.12	1.89	2.48	1.90

Anche nelle ferrovie reali sarde nel 1905 su 964 agenti si ebbero soli 140 casi di febbri, cioè appena il 16 per cento; e fino a raggiungere questa bassa proporzione la discesa fu graduale dopo introdotta la profilassi mista, prima della quale più di 40 per cento degli agenti rimanevano colpiti.

Qualcosa di simile è avvenuto lungo le ferrovie secondarie sarde.

A sua volta la ferrovia sicula occidentale, sostituendo alle protezioni personali (cappelli con velo, guanti) contro le zanzare la profilassi chininica, ha potuto mantenere il primato di una organizzazione sanitaria, in cui la profilassi antimalarica è una funzione ndispensabile dell'organismo ferroviario.

Per le *aziende rurali*, quanto giovi la profilassi mista, è dimostrato dalla seguente

TABELLA VI.

Malaria a Pontepossero e Uniti (Podere Ponti).

Anni	Popolazione colpita da febbri
Prima del 1902	60-80 %
nel 1902	50 »
» 1903	40 »
» 1904	30 »
» 1905	16 »

Cioè di anno in anno il tipo della malaria è cambiato dalla forma grave a quella lieve, e dalla lieve alla lievissima.

Ivi nel 1905 di 22 abitanti in case protette dalle zanzare 15 ammalarono di febbri primitive, mentre di 119 sottoposti a profilassi mista non ammalò nessuno (1).

(1) *La malaria in Pontepossero e Uniti* (Podere Ponti) *nell'anno 1905*. Relazione del dott. Polettini. Verona, 1906.

Così pure in Arbus (Sardegna) 51 persone sottoposte a questa profilassi tutte furono preservate.

Anche ad Argenta nella zona da anni sottoposta a profilassi si ebbe solo il 7 per cento di febbricitanti; e nelle case con profilassi mista la percentuale scese al 2 per cento, mentre nel medesimo territorio comunale, nelle plaghe non profilassate dal 12 al 34 per cento della popolazione rimase colpita.

Altri esempi che potrei citare così per l'Italia superiore (Portogruaro, podere Stucki) come per la Sicilia (possedimenti del cav. Patti, lungo la Palermo-Trapani) dimostrano che eziandio pei contadini la profilassi chimicomeccanica, cioè con la cura preventiva e la protezione della casa, riesce ad assicurare la salute e la forza di lavoro eziandio nelle pla he più desolate dalla malaria.

Anche la Commissione russa per lo studio della malaria sostiene che questa profilassi mista è la più raccomandabile.

G. — Distruzione delle zanzare.

B. Galli-Valerio e J. Rochaz de Jongh hanno dimostrato che anche le larve di *Mochlonyx velutinus* e di *Triton cristatus* mangiano le larve di zanzare; ma per averne una efficace distruzione si può contare solo sul *Telestes muticellus*, un pesce che si conserva negli acquai, nelle vasche ed è diffuso in tutte le acque dolci.

Confermarono altresì che il petrolio e il saprolo sono i mezzi, in grande, più sicuri per la distruzione di larve e ninfe di culicidi.

Ad Argenta il dott. Orta ha trovato efficace larvicida anche la miscela cuprocalcica che serve contro la peronospora.

La spesa occorrente però (6 gr. di solfato e altrettanto di calce per litro) esclude ogni idea di applicazione pratica.

Sull'azione indubbiamente larvicida delle muffe (*Aspergillus niger* e *glaucus*) in pratica non si può contare.

Da varie parti invece è confermato che la *Lemna palustris* con la sua cotenna erbacea alla superficie dell'acqua ostacola lo sviluppo acquatile delle zanzare.

Con tutto ciò non possiamo che confermare *la difficoltà, se non a dirittura la impossibilità d'una campagna zanzaricida*; e anche fuori d'Italia le profilassi miste, meccanica e antilarvale, o chimica e antilarvale (a parte la spesa), non hanno dato finora esiti più brillanti

d'una rigorosa profilassi medicamentosa o meccanica o chimicomeccanica.

Le pioggie poi durante la stagione delle febbri vengono a rendere anche più difficile una campagna artilarvale.

H. — Bonifiche idrauliche.

Possiamo ormai considerare come un assioma che: *La bonifica idraulica è solo il primo passo verso il risanamento igienico, al quale poi non si arriva che col tempo, quando interviene la bonifica agraria, e molto più presto quando interviene anche la. nuova profilassi medica antimalarica.*

Già questa nuova profilassi risparmia le vittime umane che prima durante i lavori erano fatalmente immolate alla dea febbre; accelera questi lavori, e dà tempo e modo di spender meglio i tanti milioni destinati per queste bonifiche idrauliche.

Dobbiamo sempre più insistere che si proceda secondo natura, cioè dall'alto in basso, *cominciando* con la piccola bonifica, cioè con la sistemazione idraulico-forestale dei bacini superiori tributari e *finendo* con la grande bonifica, cioè con la sistemazione idraulica delle pianure, fino alla foce del mare, e non procedendo all'inverso, come, incredibile ma vero, ancora per lo più si procede, lasciando in balìa della prima piena torrenziale tanto danaro e tante fatiche.

E poichè tutta la storia sanitaria delle nostre bonifiche dimostra che da sè sola la bonifica idraulica ben di rado, per conseguenza diretta, conduce senz'altro e senza l'opera dell'agricoltura al risanamento igienico d'un vasto territorio, così dobbiamo chiedere all'idraulico solo ciò che è più strettamente indispensabile nell'interesse dell'agricoltore, cioè più strade, più case e meno grandi opere idrauliche, e fra queste comprendere più che è possibile anche l'irrigazione e la provvista d'acqua potabile; e infine dobbiamo rendere obbligatoria, pena l'espropriazione a basso prezzo, la coltura intensiva delle terre liberate dalle acque.

È però necessaria una *radicale riforma delle nostre antiquate leggi sulle bonifiche idrauliche* per armonizzarle con le moderne vedute scientifico-pratiche.

Ad ogni modo, di fronte ad una bonifica idraulica da farsi *il concetto sanitario non è più l'unico predominante, e sottentra imperioso il concetto economico*; devesi cioè valutare se c'è il tornaconto di farla e con quale metodo più sicuramente e più presto si raggiunga questo tornaconto.

Merita qui fermarsi a rilevare che per le bonifiche idrauliche in Italia (1) si erano già spesi, a tutto il 1877, 92 milioni; a tutto il 1903 se ne spesero ben 205 milioni. Nel 1903 ne restavano da spendere ben 292 milioni. Quindi per bonificare in tutto ha. 1,155,000 di terreni paludosi si verrà a pagare lire 427 per ha. e quindi lire 0. 42 il mq.

Alcune bonifiche hanno costato somme anche più favolose, per esempio il Bocci (2) nel 1901 aveva coi soli interessi semplici calcolato che si erano spese:

L. 1,455 per ha. di prosciugamento meccanico a Maccarese;
» 5,832 » di colmata del Lamone presso Ravenna;
» 12,966 » » di Maremma;
» 20,854 » di prosciugamento di Palude Pontina.

E ultimamente altri milioni si aggiunsero a quelli già spesi per queste ultime bonifiche, e se ne aggiunsero da spendere altri 11 per la Sardegna, altri 21 e mezzo per la Basilicata, e altri 8 per le Calabrie.

Prima si credeva che l'unico o almeno l'indispensabile modo di sgominar le febbri fosse la bonifica idraulica, e quindi nel supremo interesse della pubblica salvezza dalla malaria non si badava a spese.

Oggi però con molto meno, con infinitamente meno, cioè con buon chinino e con buone abitazioni difese da zanzare, possiamo proteggere l'uomo dalle febbri e permettergli di lavorare la terra anche la più pestilente.

Nessuna meraviglia quindi se con tanti anni e con tanti milioni spesi per le bonifiche idrauliche non si è ottenuto quanto con soli 4 esercizi finanziari e con varie migliaia di lire d'utili netti si è ottenuto dalle leggi sul chinino di Stato, col ridurre, come vedremo, notevolmente la mortalità per malaria.

In ogni modo *la bonifica idraulica deve essere coordinata, e meglio anzi subordinata, al duplice interesse dell'agricoltura e dell'igiene.*

K. — Bonifiche agrarie.

Anche nel bacino del Sarno, quindi nell'Italia più calda, dove l'agricoltura intensiva si è impadronita delle terre emerse fra il paludismo ancora superstite con tutto l'anofelismo, la malaria ha finito con lo scomparire.

---

(1) *Prima relazione sulle bonifiche di prima categoria*, presentata alla Camera dei Deputati nella seduta del 25 maggio 1903. Atti parlamentari, volume XXV documenti. Roma, 1903.

(2) *Trattato della Bonifica idraulica*, ecc., 2ª edizione. Roma, 1901.

E più presto oggi potrà scomparire sotto l'azione combinata dell'agricoltore e del medico igienista.

La colonizzazione del latifondo, la coltura intensiva della terra abbandonata per colpa della malaria, sono problemi ormai facili a risolvere.

E già grandi iniziative di colonizzazione, destinate a sicuro successo igienico-economico, sorgono in varie parti d'Italia.

Data l'importanza, o, meglio, la necessità dell'abitazione, specialmente difesa dalle zanzare, in luogo di malaria, è peccato che dal 25 febbraio 1904 sia ancora lettera morta, per mancanza del regolamento, l'articolo 15 dell'ultima legge sanitaria che obbliga i proprietari, pena severe ammende, a riparare o costruire case rurali e ricoveri per operai avventizi,

Ad ogni modo le *abitazioni*, i *ricoveri-dormitori* pei contadini sono una necessità assoluta e i fondi destinati o da destinarsi per bonifiche e colonizzazioni a questa prima necessità devono provvedere.

Meritano, intanto, lodi il generale Ricotti e il barone Casana che in Lomellina hanno costruito dormitori, che possono servire di modello, per le mondatrici del riso.

Anche le *locande sanitarie*, o cucine economiche pei contadini avventizi durante i grandi lavori dei raccolti sono un utilissimo complemento degli altri mezzi di lotta contro la malaria.

J. — Legislazione sanitaria speciale contro la malaria.

Dobbiamo ancora una volta lamentare che le leggi 25 febbraio 1904 (chinino gratuito a scopo curativo per tutti i poveri) e del 19 maggio 1904 (chinino gratuito anche a scopo preventivo per tutti i lavoratori), non hanno il loro regolamento. Mancano pure per gli ufficiali sanitari le istruzioni che siano di guida alla profilassi. Auguriamo che il ritardo ne perfezioni la forma e la sostanza.

Per esempio, bisognerebbe togliere ai medici l'obbligo di riempire tanti moduli di ricette e registri, caso per caso, volta per volta; intieramente, come la legge vuole, alla loro competenza e responsabilità dovrebbe essere affidata la distribuzione del chinino.

Nemmeno abbiamo ancora la tanto invocata legge sulle risaie.

Mentre poi il servizio del chinino di Stato progredisce di anno in anno, parecchie amministrazioni comunali, in ispecie nelle regioni

più malariche, si lamentano delle difficoltà che incontrano per riavere dai proprietari di terre le somme anticipate nell'acquisto del prezioso farmaco.

Queste difficoltà dipendono dalla mancanza di regolare e bene aggiornato catasto, dalla frequente e continua emigrazione temporanea dei contadini, a scopo di lavoro, da un comune all'altro, massime quando le circoscrizioni territoriali comunali sono così irregolari e frastagliate come assai spesso in Sicilia.

In questi casi, e ove la malaria è più grave, bisognerebbe poter dichiarare intieramente malarici un distretto, un circondario, una provincia, e fare anticipare dalle provincie la spesa pel chinino occorrente nei singoli comuni, ripartendola poi, secondo le norme in vigore, a carico dei proprietari del rispettivo territorio.

In ogni modo le quote di rimborso dovute dai proprietari di terre per l'acquisto del chinino dovrebbero ad ogni effetto essere considerate quali sovraimposte fondiarie, ed iscritte poi sempre nei relativi ruoli al nome di coloro che sono intestati in catasto sui fondi nei quali esistono le zone malariche.

L. — Organizzazione della campagna antimalarica.

Secondo le nostre leggi, dipende intieramente dalla organizzazione della vigilanza igienica e dell'assistenza sanitaria nei *Comuni*. E poichè questa e quella sono ancora in molti e molti comuni molto difettose, s'intende subito quali ostacoli debbano incontrare, per essere integralmente applicate, le nostre leggi contro la malaria. Senza ripetere le cause del disordine (1) che troppa spesso regna in questo nuovo servizio sanitario, specialmente dove è più indispensabile, invochiamo dalle autorità centrali e provinciali un'azione integratrice per tutte le regioni di malaria più grave, potendosi e dovendosi a tale uopo rivolgere e bene utilizzare la intiera somma dei proventi netti del l'azienda del chinino di Stato (v. tabella 7).

Nei mesi almeno di epidemia occorrono ispettori circondariali a lato ed alla dipendenza dei medici provinciali, e vicino ai medici locali occorrono aiutanti, od agenti, almeno per la distribuzione del chinino in campagna.

Possono anche molto giovare gli ambulatori antimalarici, come a Mantova.

---

(1) V. Organizzazione della guerra alla malaria. Nuova Antologia, 16 febbraio 1906.

Le nostre *Associazioni sanitarie,* fatta nobile eccezione dei medici condotti vercellesi, non sono ancora attivamente entrate in questa campagna, nella quale c'è da cogliere tanta simpatia e pubblica benemerenza.

La *Croce Rossa* invece da Roma ha esteso la sua missione altamente benefica in Sicilia presso le miniere, e in Calabria dopo il terremoto. E tutto fa sperare possa sempre più estenderla.

Alle *ferrovie* e ai *rispettivi medici sociali* dobbiamo un'attiva propaganda antimalarica per tutto il Mezzogiorno e nelle Isole. Col nuovo esercizio di Stato, questa propaganda collaterale sarà anche più attiva ed efficace.

L'*esercito* dove la profilassi chininica si diffonde sempre più sarà anche in questo senso una scuola per tanta parte della nostra popolazione.

Così dicasi delle *grandi industrie,* specie minerarie (in Maremma, Sicilia e Sardegna), e delle *grandi imprese assuntrici di pubblici lavori,* obbligate a eseguire, pena forti ammende, la nuova profilassi, e in genere di tutte le *amministrazioni dello Stato* che hanno lo stesso obbligo pei loro dipendenti che lavorino in località di malaria.

Per mezzo della *Scuola normale e popolare* venne fatta e sarà continuata un'energica propaganda. Molti maestri se ne resero già benemeriti.

Peccato che nei mesi di epidemia più intensa cessi la scuola, altrimenti la gratuita distribuzione del chinino di Stato ai ragazzi contribuirebbe alla migliore educazione igienica antimalarica.

Le *Camere del lavoro* e le *Leghe dei contadini* furono da più parti cointeressate per diffondere la conoscenza dei nuovi diritti che spettano ai lavoratori in luoghi di malaria, e per vincere l'apatia e l'indolenza della gente di campagna in ispecie meridionale e insulare.

Le *Cattedre ambulanti di agricoltura,* per merito del prof. Giacomo Rossi e della sua benemerita Stazione agricola antimalarica presso la scuola superiore di Portici, sono già alleate preziose del medico, e insieme organizzano Comitati antimalarici nel Mezzogiorno, come pure se ne organizzarono a Mortara e nel basso Friuli.

Grandi *proprietari di terre,* come il Banco di Napoli, la Banca d'Italia e rari latifondisti, cominciano a comprendere che il loro primo interesse è di mantener sano, con spesa minima, chi meno per sè che per essi lavora.

Il nostro contadino vuole toccar con mano un benefizio; ma una volta che se ne è persuaso pensa lui a conservarselo.

E ormai dove i nostri soci lavorano da 3-4 anni a catechizzare coi fatti la profilassi chininica, i contadini cercano il chinino più che il sale, e senza più bisogno di eccitamento del medico pensano da se stessi a preservarsi dalle febbri.

Lieta di questi risultati la nostra Società si appresta ad insistere nella propaganda, e ha quindi aggiunto alle altre pubblicazioni popolari un decalogo, che sarà diffuso a migliaia e migliaia di copie, per insegnare, a chi appena sa leggere, come si deve fare uso del chinino di Stato per preservarsi e per curarsi dalle febbri, e chi ha diritto di averne e chi ha il dovere di darne.

Con fini e metodi identici ai nostri e con vicendevole emulazione sorsero nel 1902 la *Ligue contre le paludisme en Algérie*, così egregiamente diretta dai fratelli Sergent, la *Ligue corse contre le paludisme* (1), e la Commissione per lo studio della malaria in Russia, guidata da Gabritchewski.

Nell'anno scorso venne anche in Grecia fondata una lega contro la malaria.

Così in Ispagna e Portogallo nella Penisola iberica, come in Serbia e Rumenia nella Penisola balcanica, speriamo sorgano simili organizzazioni, che, insieme confederate, potranno costituire una grande *Lega internazionale* o almeno *mediterranea contro la malaria*, quale da tempo andiamo auspicando.

M. — Considerazioni statistico-economiche.

Giova, qui infine, mettere a confronto il consumo del chinino di Stato con la mortalità per malaria (2) in tutta Italia, e nell'istesso tempo tener conto anche degli utili netti della nostra grande azienda del chinino di Stato:

---

(1) Alla memoria dell'egregio presidente di questa lega, il dott. Battesti, immaturamente perduto in quest'anno, vada il nostro riverente ricordo.

(2) Della morbosità per malaria non è possibile tener conto. Le denunzie dei casi divennero obbligatorie dal 1901 in poi; ma in realtà non si fanno — e non si possono fare — che assai incompletamente. E siccome ai medici comunali si richiedono spesso per giustificare il consumo del chinino gratuito, così, aumentando questo di anno in anno, anche le denunzie parallelamente crebbero mentre notoriamente è assai scemata la mortalità.

TABELLA 7.

Chinino di Stato e mortalità per malaria in Italia.

Consumo di chinino di Stato		Mortalità per malaria		Utili netti dell'azienda del chinino di Stato — Lire
Anno finanziario	Chilogrammi venduti	Anno	Totale morti	
...	...	1900	15,865	...
...	...	1901	13,358	...
1902-1903	2,242	1902	9,908	34,000
1903-1904	7,234	1903	8,513	180,000
1904-1905	14,071	1904	8,501	171,000
1905-1906	18,712	1905	7,838	230,000

La tabella precedente dimostra che *col progressivo aumento annuale del consumo di chinino nello Stato, fino a superare i 18,000 chili nell'esercizio scorso, la mortalità per malaria è progressivamente discesa fino al disotto della metà della media, che dal 1887 al 1905 si aggirò intorno ai 15 mila morti.*

Questa intima e benefica correlazione da nessuno può essere disconosciuta, dappoichè prima del chinino di Stato i morti per malaria furon nel precedente quindicennio:

Nel 1887	21,033	Nel 1895	16,464
» 1888	15,987	» 1896	14,017
» 1889	16,194	» 1897	11,947
» 1890	15,147	» 1898	11,378
» 1891	18,190	» 1899	10,811
» 1892	15,531	» 1900	15,865
» 1893	15,301	» 1901	13,561
» 1894	15,296		

Queste cifre ci dicono che dopo il 1891 erasi iniziata nella mortalità per malaria una diminuzione, che fu interrotta però dalle recrudescenze periodiche negli anni 1895 e 1900. Anche negli anni migliori, come il 1899, la minima mortalità si manteneva sui circa 11,000 morti.

La discesa progressiva e persistente della mortalità proprio nell'ultimo quadriennio, nel quale l'epidemiologia può escludere, almeno per quell'Italia dove più si muore di malaria, l'eventualità di una attenuazione spontanea, non può non attribuirsi a merito del chinino di Stato, che nel corrispondente periodo di tempo s'è diffuso sempre più fra quei miseri che per mancanza del rimedio specifico eran vittime della malaria.

Qui nell'*Agro Romano*, dove la sola reale bonifica fu sinora quella dell'uomo, con la massima profusione (1) del chinino di Stato, ad onta che la popolazione operaia specie dei fornaciari nel suburbio e quella di compagna siano cresciute, ad onta sia di molto salito, dopo l'apertura del Policlinico, il numero dei malati di qualsiasi malattia, nondimeno l'epidemia, sebbene per sè grave, non toccò le altezze che prima erano consuete, ed anzi nella sfera di azione della Croce Rossa (tab. 8) non fu nemmeno avvertita una recrudescenza, e in totalità, per tutti gli ospedali il numero dei malarici non superò i 4000, compresi i recidivi.

TABELLA VIII.

Chinino di Stato e malaria nell'Agro Romano.

	1900	1901	1902	1903	1904	1905
Profilassati nell'Agro Romano	..	1,176	3,853	17,506	29,693	38,429
Infezioni primitive curate dalla Croce Rossa	1,716 (17 %)	1,263 (16 %)	764 (7 %)	320 (2 %)	162 (1.34 %)	250 (1.52 %)
Malarici curati dalla Croce Rossa	3,751 (31 %)	2,366 (26 %)	2,581 (20 %)	1,547 (11 %)	1,406 (10 %)	839 (5.1 %)
Malarici ricoverati negli Ospedali di Roma	6,186	4,725	2,750	2,461	2,961	3,991

Notisi poi che dal 1892, cioè da quando abbiamo una regolare statistica sanitaria degli ospedali, si è verificata regolarmente una recrudescenza quinquennale, cioè negli anni 1895 e 1900; or bene una recrudescenza nel 1905 venne a mal'appena avvertita.

(1) Il Comune di Roma ne ha comprati 500 chili nel 1904, e 700 chili nel 1905.

Sugli *effetti economici* di così diminuita mortalità e morbosità è ormai superfluo insistere.

Ricorderemo solo che in Sardegna con circa lire 3500 di spesa pel chinino si risparmiarono in giornate di lavoro più di 10,000 lire.

E sulle ferrovie reali sarde con poco più di lire 3 di spesa per chinino a testa, gli agenti non perdettero che poco più di una giornata di malattia.

Anche sulle ferrovie meridionali questa perdita (v. tabella 5) si ridusse a giornate 1.90 a testa.

Ricorderemo infine che dal Veneto, al Lazio, alle Puglie, alla Sicilia, dove la profilassi chininica o mista sono attuate, i lavori agricoli non sono più come prima soggetti alla tirannia della malaria, e gli stessi proprietari vantano gli incalcolabili vantaggi economici che ne risentono.

Anche nell'*esercito*, ad onta delle grandi manovre in settembre nella Valle del Volturno, ad onta dei numerosissimi distaccamenti inviati per gli scioperi agrari delle Puglie e pel terremoto di Calabria, si ebbe:

	1903	1904	1905
Totale dei malarici	4985	4047	4701
» » recidivi	3687	2679	2848
» » primitivi	1298	1368	1853
Proporzione dei malarici °/₀₀ di forza	27.14	19.21	23.00

Quindi fu assai lievemente avvertita la recrudescenza epidemica del 1905.

N. — Conclusioni profilattiche.

La mortalità per malaria ha ceduto ancora, nel 1905, dinnanzi all'avanzarsi del chinino di Stato.

E ormai da un estremo all'altro d'Italia i nostri soci hanno sparso il seme fecondo della nuova profilassi.

Sono però ancora troppe le 7-8 migliaia di persone che muoiono — e non dovrebbero morire —, e le migliaia e le migliaia che ammalano — e molto meno dovrebbero ammalare — di malaria.

Siamo quindi appena all'alba della redenzione dell'Italia da questo flagello.

Ma l'esperienza ormai di 7 anni ci prova che siamo sulla via maestra verso questa grande e ardua meta.

Un buon servizio igienico-sanitario antimalarico nei territori anche più infesti arriva, purchè si voglia, a mantener sano l'uomo, che può così lavorare dove prima ammalava o moriva di febbre.

Questo è già molto. Ora però più che mai urge di coordinare opere forestali, idrauliche e di bonifica in modo da farle convergere verso la coltura intensiva delle terre infeste da malaria. Ma, per raggiungere quest'ultimo essenziale scopo, meglio bisogna impiegare le ingenti somme che già sono preparate, e che possono, purchè si voglia, trasformare la faccia della terra e stabilmente renderla prospera e sana.

L'Italia ha quindi in sè tutta l'energia per liberarsi dal più temuto nemico del suo territorio.

Possa presto svilupparla mediante quell'organizzazione che ora è più difettosa dove è più necessaria.

Roma, 30 giugno 1906.

Istituto Sieroterapico Milanese

Sul dosaggio del siero anticarbonchioso

Ricerche sperimentali del dott. **ALBERTO ASCOLI.**

L'applicazione di ogni siero curativo e preventivo è subordinata, oltrechè alla riprova clinica di esso, alla possibilità di dimostrarne in modo evidente l'azione contro i rispettivi germi o veleni colle esperienze sugli animali. Il problema del dosaggio del valore felicemente risolto per una serie di sieri ad azione curativa e preventiva ha incontrato invece finora difficoltà grandissime per il siero anticarbonchioso, di cui pure l'efficacia sembra ormai assodata principalmente per merito dello Sclavo e di Sobernhein.

Non sono mancati i tentativi diretti a dimostrare l'azione protettiva di esso negli animali da laboratorio. Già Sclavo (1) fin dalle prime ricerche era riuscito a proteggere i conigli mediante il siero anticarbonchioso contro l'infezione carbonchiosa e anche Marchoux (2) potè stabilire un'azione preventiva e curativa del siero nel coniglio, mentre nella cavia i risultati furono dapprima poco incoraggianti. Sclavo (3 e 7) in seguito vide che mediante il siero era possibile salvare il coniglio soltanto contro un germe capace di uccidere il controllo in 40-50 ore, ma non contro un ceppo più virulento; nella cavia usando un germe attivo ottenne soltanto un ritardo nella morte, mentre riusciva a difenderla contro il primo vaccino Pasteur, specialmente se iniettato nel peritoneo. Sobernheim (4 e 6) che nelle sue prime ricerche soltanto di rado aveva potuto osservare una azione protettiva del siero nel coniglio, in seguito si convinse che, se pure era possibile ottenere la sopravvivenza dei conigli, l'azione

del siero si esplicava in modo affatto irregolare e incerto; nei topi e nelle cavie ottenne risultati che non gli parvero specifici per il siero anticarbonchioso. Sawtchenko (5) invece paragonando sul topo il potere preventivo del siero anticarbonchioso con quello normale ammetteva che il primo soltanto conferisse l'immunità passiva. Sanfelice (8) e Mendez (9) osservarono pure un'azione preventiva e curativa del siero nel coniglio e Mendez anche nella cavia. Ottolenghi (10) riprendendo le prove fatte da Sclavo sulla cavia riusciva a proteggerla validamente da dosi mortali di secondo vaccino e anche di carbonchio non attenuato, quando l'iniezione di siero era stata fatta 24 ore innanzi l'infezione sia che questa fosse praticata sottocute o in peritoneo. Schubert (11) invece non ottenne nell'istituto di Ehrlich risultati altrettanto favorevoli come quelli ai quali giunsero gli ultimi autori menzionati, tanto che egli dalle sue ricerche conclude con Sobernheim (12) *che negli animali da laboratorio la titolazione del siero anticarbonchioso si infrange contro il comportamento irregolare dei medesimi.* Sclavo (13) nella sua monografia riafferma che il siero anticarbonchioso è in grado di salvare il coniglio e anche la cavia; e così pure Bail (14) e Deutsch (15) ammettono che col siero anticarbonchioso si conferisce al coniglio un'immunizzazione passiva contro il carbonchio.

I risultati ottenuti dai vari sperimentatori sono dunque contraddittori per quanto sieno molto più numerose le esperienze che escluderebbero la possibilità di dosare il siero anticarbonchioso sui piccoli animali. Le cause di un tale dissenso, per tacere delle differenze individuali osservate, risiederebbero secondo Sclavo nella diversa attività dei sieri impiegati, secondo Sobernheim andrebbero ricercate invece nella diversa virulenza delle culture usate; a favore di quest'ipotesi parlerebbero anzi le esperienze dello Sclavo stesso, il quale con uno stesso siero riuscì a salvare il coniglio contro un dato ceppo, a ritardarne invece soltanto la morte contro un altro; con una tale ipotesi si spiegherebbe pure come un siero, che secondo Sclavo salvava il coniglio già alla dose di un cmc., a Sobernheim non desse che un ritardo nella morte.

***

Riandando le esperienze finora eseguite si resta colpiti nel vedere che, se non mancarono le varianti nel modo di somministrazione e nella quantità del siero e della cultura e negli intervalli tra le due iniezioni, ciascun esperimentatore per tutto il corso delle sue

ricerche si servì di una o tutt'al più due culture virulente di carbonchio, e di uno o più vaccini o culture artificialmente attenuate. Se dunque i risultati ottenuti erano stati più o meno buoni a seconda della virulenza dei germi usati, non era del tutto infondata la *speranza di imbattersi in un ceppo di una virulenza tale, da rappresentare l'*optimum *per la dimostrazione del valore preventivo del siero.*

Guidato da tale concetto del mio carissimo maestro, il professor Belfanti, mi indussi a tentare una serie di dosaggi sui conigli valendomi dei ceppi di bacillo carbonchioso della nostra raccolta, isolati da casi di carbonchio nell'uomo e negli animali grossi; nonchè del ceppo usato da Deutsch e da lui gentilmente favoritomi. Per le mie esperienze scelsi appunto quelle colture della nostra raccolta, per le quali dalla riprova sull'asino e sul coniglio era risultata una virulenza non eccessiva, ma sufficiente per uccidere quasi costantemente i controlli.

Salvo le ultime serie di esperienze, per le quali presi conigli oltre i 2000 gm., nelle altre usai conigli di minore peso dai 1000 ai 1500 gm.: iniettavo loro il siero alla dose di 1-3 cmc. nella vena auricolare e, circa 24 ore dopo, sottocute alla spalla destra, 1-2 anse di una coltura su agar di 12-24 ore emulsionata in 1-2 cmc. di brodo o soluzione fisiologica.

Il siero anti-carbonchioso che di regola era fresco e non addizionato di antisettici proveniva da due asini (n. 3 e n. 4) e da una capra, solidamente immunizzati, del quale le esperienze sulla cavia dimostrarono poi il valore protettivo, in alcune esperienze fu usato un siero anticarbonchioso di cavallo fenicato al 0.5 % favoritomi dall'istituto Jenner-Pasteur di Budapest. Il siero normale era fornito da asini (nn. 1, 2, 5, 6) che servivano ad altre esperienze di immunizzazione. Le esperienze comprendono complessivamente 106 conigli distribuiti in nove serie, nelle quali furono saggiati cinque ceppi diversi (Dir. Ger. Asc. P. M. Deutsch).

Senza volermi addentrare in una discussione troppo minuta dei risultati poco confortanti emersi dalle mie ricerche, accennerò soltanto che delle colture usate quella contrassegnata colle iniziali P. M. e la coltura Ger. si sono dimostrate come le meno adatte allo scopo, poichè i conigli passivamente immunizzati presentarono tutt'al più un lieve ritardo nella morte di fronte ai controlli.

Il carbonchio Dir. alla dose di 2 anse non risparmiò nessun coniglio tra quelli del peso di 1300 gm. circa, ma l'esito letale fu ritardato quasi costantemente e in un caso si ebbe appena in

15ª giornata; tra i conigli grossi di 2000–3000 gm. resistettero alla infezione carbonchiosa quattro, tra i quali un controllo, il quale insieme con un altro fu poi vittima di un' infezione polmonare, la quale colpiva con una certa preferenza i conigli usati. Un risultato analogo fu ottenuto nei conigli piccoli di 1200–1300 gm.: usando soltanto un' ansa di carbonchio Dir. trionfarono dell'infezione carbonchiosa un coniglio immunizzato ma anche un controllo, così che dovetti desistere da ulteriori tentativi.

Il carbonchio Asc. alla dose di due anse uccise tutti i conigli salvo uno tra gli immunizzati; ma in questi non vi fu sempre ritardo nella morte. mentre invece morì appena dopo 22 giorni un coniglio, che aveva ricevuto soltanto del siero normale. Alla dose di un'ansa scamparono due tra i conigli, ai quali era stato iniettato del siero anticarbonchioso di asino e in altri due, che morirono con ritardo, non fu possibile stabilire la morte per carbonchio, ma complessivamente neppure qui i risultati furono abbastanza chiari per incoraggiarmi ad insistere nelle esperienze con questo ceppo.

La coltura, preconizzata dal Deutsch per il saggio del siero anticarbonchioso e da lui gentilmente favoritami, non uccideva con sufficiente costanza i controlli, perchè i risultati apparentemente buoni, ma troppo poco numerosi, ottenuti in una prima serie, potessero essere utilizzati a scopo di dosaggio: un raffronto fra le due serie di prove fatte con questo ceppo è molto istruttivo appunto perchè ci dà forse la chiave di tanti successi fondati sopra un materiale troppo scarso.

In ultima analisi dunque *nessuno dei ceppi da me provati sul coniglio corrispose all'aspettativa, ma pure non insistetti nelle ricerche. perchè nel frattempo le esperienze sulla cavia erano approdate a migliori risultati.*

***

Le prove da me istituite sulle cavie per la maggior parte furono eseguite iniettando il siero nel peritoneo, la cultura 24 ore appresso sottocute, pratica questa che era parsa la migliore anche ai ricercatori precedenti; non ricorsi mai all'iniezione endoperitoneale della cultura in vista dei risultati discordi di van Leent e Ottolenghi. Tentai invece di sostituire all'iniezione peritoneale del siero, quella sottocutanea, facendo seguire quella del virus alla distanza di 24 ore fino a giorni 5 e mezzo. La quantità di cultura iniettata fu sempre di un quarto di cmc. di cultura di 16-20 ore in brodo, e l'iniezione

del virus era praticata per solito sotto l'ascella mediante una siringa Pasteur.

Cinque furono complessivamente i ceppi da me saggiati e precisamente uno virulentissimo, uno di una virulenza media, uno un po' attenuato, un primo vaccino Pasteur ed infine un nostro vaccino a spore (vaccino N), sul quale poi verterono la maggior parte delle esperienze, poichè meglio degli altri corrispondeva allo scopo. Il siero anticarbonchioso proveniva in parte dagli asini (3 e 4) e dalla capra, che avevano fornito il siero per le esperienze sui conigli; inoltre furono saggiati anche i sieri di altri tre asini (1-bis, 5 e 6) durante il corso della loro immunizzazione, nonchè alcuni campioni provenienti dall'Istituto d'igiene di Siena e dall'Istituto vaccinogeno di Berna, ed altri favoritimi dal dottor Deutsch e dal professore Sobernheim.

Sono raccolti nella Tab. I i risultati ottenuti iniettando 2 cmc. di siero anticarbonchioso di asino nel peritoneo e vari ceppi 24 ore dopo all'ascella sottocute. Ne risulta che delle cavie passivamente immunizzate, quelle infettate col ceppo Bruzzano morirono nello spazio di 32-56 ore, quelle inoculate coi ceppi Merck ed Asc. morirono tra la quarta e l'undecima giornata; delle tredici inoculate col nostro ceppo morirono soltanto due, una in sesta ed una in nona giornata.

La cultura Bruzzano dunque, che nelle mie prove sul coniglio e sull'asino si era dimostrata come una delle più virulente della nostra raccolta, tale si manifesta anche nelle cavie immunizzate, le quali nonostante il siero vennero tutte a morire rapidamente. La cultura Asc. la quale possedeva naturalmente una virulenza mediocre, come avevo osservato sull'asino e sui conigli, e la cultura Merck attenuata artificialmente, come potei rilevare dalle istruzioni che l'accompagnavano, inoculate nelle cavie immunizzate si direbbe fossero per il siero iniettato inceppate o ritardate nella loro azione, ma tosto o tardi ebbero ragione delle cavie, le quali finirono col soccombere tutte. Il nostro vaccino invece, che possedeva già naturalmente una virulenza analoga a quella dei vaccini Pasteur, di modo che era innocuo per il coniglio, l'asino e la capra, ma uccideva di solito la cavia in giorni 2 ½-3 ½, come mi persuasi in base a numerosissime esperienze di controllo, risparmiò undici cavie su tredici immunizzate, uccidendo le due che soccombettero nonostante il siero con notevole ritardo. Parendomi che in tal modo si fossero realizzate sulla cavia mercè tale cultura le condizioni, che indarno avevo cercato di stabilire per il coniglio, tentai con essa una serie di dosaggi, di cui rendono conto le tabelle II-VIII.

Nella Tab. II sono raccolte le esperienze istituite sulla cavia col siero di una capra, la quale era in corso di immunizzazione sino dall'ottobre del 1904. Il siero prelevato da un salasso praticato li 7 agosto 1905, cioè quattro giorni dopo un'iniezione di 80 cmc. di carbonchio virulento dimostrò azione preventiva alle dosi 4, 2 e ½ cmc., mentre non ne esplicarono affatto alcuni sieri di asini normali ai quali ricorsi in mancanza di siero normale di capra. Il siero del salasso praticato li 26 settembre, cioè dopo circa sette settimane di riposo completo dell'animale, apparve invece inattivo alle dosi di 4, 2, 1 e ½ cmc., non riuscendo che a differire tutto al più la morte degli animali di fronte ai controlli. Ripresa l'immunizzazione le vennero iniettati nello spazio di meno di tre settimane circa 250 cmc. di carbonchio virulento, ma dopo l'iniezione di una dose di 100 cmc., l'animale presentando sintomi di collasso, esso fu dissanguato: il siero alle dosi di 4, 2 ½ e 1 cmc. valse a salvare le cavie, mentre le dosi di ½ e ¼ di cmc. ritardarono soltanto la morte. Le esperienze complessivamente in numero di 23 sono dunque piuttosto suggestive e in armonia con quanto era da attendersi in rapporto col corso dell'immunizzazione, e affacciano la possibilità di dosare il siero anticarbonchioso di capra mediante la nostra cultura.

Sono riportati nella tabella III i dosaggi praticati secondo lo stesso metodo col siero dell'asino 3, la cui immunizzazione risale pure all'ottobre del 1904. Il siero proveniente dal salasso del luglio 1905, praticato una settimana dopo l' iniezione di una piastra di carbonchio virulento, saggiato alla dose di 4 cmc. salvò regolarmente la cavia, mentre i controlli morirono entro giorni 2 ½-3 ²/₃. Il siero del salasso del 7 agosto si mostrò attivo alle dosi di 4, 2, 1 e ½ cmc. Dopo altre tre settimane di riposo, interrotto da due sole iniezioni di 10 risp. 25 cmc. di carbonchio, al 26 settembre il siero apparve meno attivo salvando la cavia alla dose di 2 cmc., ma non a 1, nè a 1 ½ cmc. Ripresa l'immunizzazione, il siero dei salassi dell' 11 ottobre e del 30 ottobre si dimostrò attivo alle dosi saggiate. I dosaggi praticati col siero del salasso del 3 gennaio 1906, dopo l' iniezione di dosi medie di carbonchio, furono meno regolari, perchè, se una cavia morì in seguito ad ascessi multipli dovuti ad uno streptococco potendosi escludere con sicurezza il carbonchio, un'altra invece morì certamente di carbonchio, una sola si salvò. Regolari furono poi in seguito i dosaggi eseguiti coi sieri dei salassi praticati il 10 gennaio, il 15 gennaio e l' 8 febbraio, dai quali concordemente risultò la loro efficacia preventiva.

Complessivamente dunque su un totale di 54 esperienze compresi i

controlli, una sola ebbe forse un andamento irregolare, poichè a spiegare gli altri tre insuccessi si può invocare una minore attività del siero in seguito alla sospensione delle iniezioni di carbonchio.

La tabella IV raccoglie i dosaggi praticati col siero dell'asino 4, la cui immunizzazione procedette parallela a quella dell'asino n. 3. Il siero del salasso praticato ad immunizzazione espletata, dopochè l'asino aveva ricevuto e tollerato bene dosi fortissime di carbonchio virulento, saggiato alla dose di 2 cmc., salvò due cavie su tre; la terza però morì con notevole ritardo sui controlli. Ripresa l'immunizzazione dopo un riposo prolungato, dai dosaggi fatti dal luglio al novembre, risulterebbe che l'azione preventiva del siero, fattasi minore nel luglio, nei mesi seguenti era di nuovo al livello primitivo. Scorrendo la tavola, a prima vista si resta colpiti dal risultato apparentemente contraddittorio ottenuto col siero del 27 ottobre; il quale però dovrebbe essere spiegato a sufficienza, se si pone mente alla differenza di peso degli animali, di modo che, calcolando il siero per 100 grammi di animale, la dose iniettata sarebbe la stessa per ambedue le cavie. La causa poi dell'esito diverso dei dosaggi praticati col siero del 10 novembre e con quello del 13 novembre potrebbe risiedere nel fatto che, essendosi salassato abbondantemente l'asino il giorno 10, il siero poteva aver perduto del suo valore, come si osserva nei sieri antitossici. Le titolazioni dei sieri del gennaio e febbraio sono regolari, eccezion fatta per una cavia, la quale morì, ma con un ritardo di una settimana sui controlli. *Riassumendo anche in queste serie si sono avuti buoni risultati col metodo da me seguito nè, tra le esperienze riportate, v'è alcuna serie in cui la dimostrazione del potere preventivo sia completamente fallita.*

I dati contenuti nella tabella V non ci consentono invece alcun giudizio sul valore del nostro metodo, poichè il siero saggiato alle dosi di 4, 2 e 1 cmc. esplicò un'azione preventiva debole ed incostante, anche quando l'animale era solidamente immunizzato in modo da tollerare dosi grandi di carbonchio virulento. La causa di ciò potrebbe risiedere nell'animale stesso, ma è forse più probabile che i risultati fossero offuscati da un trattamento subìto prima dall'asino, essendo stato esso utilizzato precedentemente per la preparazione di un siero citotossico per la cavia.

Sono invece particolarmente interessanti e dimostrative le tabelle VI, VII e VIII, poichè ci danno modo di raffrontare il valore preventivo del siero dello stesso animale prima e dopo l'immunizzazione contro il carbonchio. Il siero dell'asino 6 saggiato alle dosi di ½-4 cmc. prima di iniziare l'immunizzazione, salvò una

sola cavia su otto trattate; saggiato alla dose di 2 e 4 cmc., dopo la iniezione di vaccino carbonchioso, non esplicò azione preventiva di sorta. Riprovato invece il siero, dopo che l'asino aveva ricevuto e tollerato dosi forti di carbonchio virulento, ne risultò invece evidente il valore protettivo nelle titolazioni del 6, 13, 22 e 23 novembre, delle quali non sono perfettamente regolari soltanto quelle in cui fu usato il siero proveniente dal dissanguamento dell'asino; se tali irregolarità sieno da attribuirsi alle condizioni speciali di choc, per le quali si rese necessario il dissanguamento, o vadano piuttosto riferite a differenze individuali atte a turbare, ma non a sconcertare il metodo proposto, non credo si possa decidere, se non in base ad un materiale più largo e variato di quello, a cui dovetti limitarmi nelle mie esperienze.

Non sono molto numerose, ma oltremodo suggestive le esperienze, delle quali dà conto la tabella VII, la quale rispecchia la storia di un asino entrato nella prima metà di novembre, immunizzato con vaccini e piccole dosi di carbonchio fino al capo d'anno e poi con dosi forti di carbonchio virulento nel corso del gennaio. I risultati delle titolazioni eseguite col siero prelevato prima di iniziare il trattamento (13 novembre), poi prima di passare a dosi forti di carbonchio (3 gennaio) e infine ad immunizzazione compiuta (27 gennaio e 8 febbraio) corrispondono perfettamente ai postulati più rigorosi, che si possano esigere dal dosaggio di un siero.

Nella tabella VIII sono riportati i dosaggi praticati col siero di un asino entrato insieme al precedente, ma il trattamento del quale richiese maggior tempo.

Nel corso delle esperienze furono intercalati dei controlli in numero di trenta per assicurarmi che il siero di asino non trattato contro il carbonchio non è in grado di proteggere la cavia contro la coltura da me usata nelle condizioni accennate. In una sola esperienza su trenta vi fu sopravvivenza, così che è lecito concluderne che si tratta di una eccezione non atta a infirmare il metodo proposto.

Constatai pure che nè il siero di cavallo non immunizzato contro il carbonchio nè il brodo comune iniettati alla dose di 2-4 cmc. esplicano azione protettiva alcuna.

Complessivamente sono dunque 289 le esperienze istituite insieme coi controlli sulla cavia secondo il metodo su accennato con sieri di asini immunizzati contro il carbonchio e non, ed esse salgono a 310 aggiungendovi altre venti registrate nella tabella IX, nelle quali fu usato sia un miscuglio degli asini 3 e 4, sia siero proveniente

dall'istituto vaccinogeno di Berna e dall'istituto di igiene sperimentale di Siena.

Sebbene non mi creda autorizzato a trarre già ora una conclusione sul valore di questo metodo, perchè già troppo si è peccato in materia anche da profondi conoscitori dell'argomento, va però rilevato che, anche nella peggiore delle ipotesi, ove non si riuscisse con esso ad un dosaggio esatto del siero anticarbonchioso, *certamente con esso è possibile sceverare i sieri di asini fortemente immunizzati, da quelli dei non immunizzati.*

***

Fatto così il primo passo ho cercato di dosare alcuni sieri anticarbonchiosi del commercio. Le titolazioni riportate nella tabella IX riguardano tre campioni di siero anticarbonchioso di asino, due campioni di siero anticarbonchioso di cavallo, uno di siero di pecora ed infine un miscuglio di sieri anticarbonchiosi di pecora, di vacca e di cavallo. I tre campioni di siero anticarbonchioso di asino, provenienti l'uno dall'istituto stesso, l'altro da Berna, il terzo da Siena (v. sopra) diedero risultati diversi. Il nostro siero, un miscuglio dei sieri degli asini tre e quattro (v. tabelle III e IV), non essendo fenicato, potè essere saggiato alla dose di 4 cmc., e a tale dose salvò le quattro cavie iniettate; non fu saggiato a dosi minori, poichè l'efficacia dei suoi componenti era già assodata ad esuberanza, come risulta dalle tavole corrispondenti. Il siero del professore Sclavo esplicò azione protettiva alle dosi di 2, 2 e 1 cmc., ritardò la morte alle dosi di 2 ½ e 1 cmc., riuscì completamente inefficace contro il carbonchio alla dose di ½ cmc.: la regolarità del dosaggio è turbata dal risultato ottenuto colla dose di 2 ½ cmc., per la quale non saprei trovare, se non si vuol ricorrere all'ipotesi di una reazione esagerata individuale, altra causa, che un'azione tossica del siero per il quantitativo abbastanza grande usato specialmente avuto riguardo al fatto che esso era addizionato di etere.

Il siero proveniente da Berna non fu in grado che di ritardare la morte alle dosi di 2 e 1 ½ cmc., si dimostrò completamente inefficace alla dose di 1 cmc.

Dei due sieri anticarbonchiosi provenienti da cavalli immunizzati contro il carbonchio, quello favoritomi dal dottor Deutsch — al quale rinnovo i miei ringraziamenti per aver messo a mia disposiziane una boccetta di tale siero — salvò la cavia alla dose di 2 cmc., ritardando soltanto l'esito a dosi minori; quello mandatomi dal pro-

fessore Sobernheim (siero Sob. II), il quale nella lettera accompagnatoria era designato come un siero di valore mediocre, saggiato alle dosi di 2, 1 ½ e 1 cmc. salvò la cavia alla dose di 2 e 1 ½ di cmc., ne ritardò la morte alla dose di 1 cmc.

Risultandomi da esperienze istituite in proposito che il siero di cavallo non immunizzato non protegge la cavia, se ne dovrebbe dedurre che il metodo proposto è estensibile anche al siero anticarbonchioso di cavallo.

L'unico siero di pecora immunizzata contro il carbonchio (siero Sob. I) favoritomi insieme con altri due sieri antiantracici, dal professore Sobernheim — a cui perciò esprimo i miei più vivi ringraziamenti — saggiato alle dosi di 2, 1 ¼ e 1 cmc. complessivamente si mostrò più efficace del precedente, in armonia con quanto mi scriveva il dottor Burow nella lettera che accompagnava i sieri provenienti dall'istituto diretto dal professor Sobernheim. Il siero Sob. III, che, secondo le indicazioni fornitemi, era un miscuglio di 2 parti di siero di vacca, di una parte di siero di cavallo e di una di siero di pecora, che per efficacia doveva trovarsi circa in mezzo tra gli altri due, salvò la cavia a 2 cmc. e a 1 ½, ma non a 1 cmc., così che anche la titolazione di questo miscuglio secondo il mio metodo parrebbe regolare ed attendibile.

Riassumendo dunque, le 358 esperienze, compresi i controlli, in cui furono applicati nel peritoneo sieri anticarbonchiosi di cinque specie di animali diverse, e sotto cute, 24 ore dopo, ¼ di cmc. del nostro vaccino, parlano a favore della possibilità di fondare su tale procedimento un dosaggio del siero anticarbonchioso. Soltanto in base ad un materiale vastissimo sarà lecito esprimere un giudizio definitivo, ma non parmi che i limiti di errori inerenti al metodo sieno maggiori di quelli consentiti nel dosaggio di altri sieri antitossici ed anti-infettivi.

***

Nelle esperienze riferite nelle tabelle II-IX, il siero fu sempre iniettato nel peritoneo 24 ore prima della cultura; pratica questa che era già stata preferita da altri autori (Ottolenghi, Schubert) all'iniezione sottocutanea. Ho cercato di scoprire la causa di tale diverso comportamento, per cui lo stesso siero, che per iniezione peritoneale si mostra efficace contro l'iniezione del vaccino praticata a 24 ore di distanza, iniettato sotto cute, conservando lo stesso intervallo tra le due iniezioni, non salva più la cavia o solo irregolar-

mente. Le esperienze istituite in questo ordine di idee, sono raccolte nella tabella X. Da essa si rileva, anzitutto, che nei casi in cui fu usata l'iniezione contemporanea sottocutanea del siero e del vaccino, le cavie morirono nonostante il siero. Risulta, poi, che l'iniezione sottocutanea del siero, seguita a 24 ore da quella della cultura, nonostante gli stessi sieri fossero apparsi efficaci per iniezione endoperitoneale, su un complesso di 30 esperienze, compresi i controlli, non salvò che cinque cavie, ed anche queste spesso in modo irregolare ed indipendente dalla dose.

Portando invece l'intervallo tra le due iniezioni a 2 volte e, ancor meglio, a 3 volte 24 ore, i successi crebbero per numero e per regolarità, almeno per ciò che riguarda i sieri anticarbonchiosi di asino e di cavallo, benchè anche qui si noti qualche eccezione, forse dovuta ad un'infezione mista. Lasciando decorrere un tempo ancora maggiore tra le due iniezioni, cioè 4-5 volte 24 ore, l'immunità conferita alle cavie lentamente scompare, come si rileva dalle esperienze riportate. Per il siero anticarbonchioso di pecora, invece, e per il miscuglio di sieri di vacca, pecora e cavallo (Sob. I e Sob. III), i risultati non furono buoni adottando l'intervallo di 3 volte 24 ore, che si era dimostrato il migliore per quello d'asino. *Ad ogni modo però, parrebbe, in base ai risultati esposti, che anche per iniezione sottocutanea il siero anticarbonchioso di asino e probabilmente anche quello di cavallo esplichi un'azione protettiva nella cavia, ove la cultura venga iniettata appena tre giorni dopo, così che è lecito riferire la diversità dei risultati al più lento riassorbimento del siero iniettato sotto cute in confronto dell'iniezione endoperitoneale.*

***

In un'ultima serie di esperienze, infine, ho sostituito al nostro vaccino quello tipo Pasteur. Nella tabella XI ho raccolto le prove istituite sulla cavia, sia iniettando il siero nel peritoneo e la cultura, 24 ore dopo, sotto cute alla spalla, sia praticando l'iniezione sottocutanea del siero, ad essa facendo seguire quella della cultura, ora alla distanza di 24 ore, ora di 3 × 24 ore. La cultura usata è stata sempre una cultura in brodo di 24 ore, e di essa iniettavo regolarmente $^1/_4$ di cmc. per cavia, sottocute alla spalla; in tali condizioni essa uccideva la cavia in 2 $^1/_2$-3 giorni, come mi persuasi istituendo numerosi controlli. Nè il siero normale di asino, nè quello di cavallo, e nemmeno il brodo comune iniettato nel peritoneo, alle dosi di 4 e 2 cmc., esplicarono azione protettiva di sorta contro

l'iniezione di tale cultura. Invece i diversi sieri anticarbonchiosi di asino saggiati spiegarono nelle medesime condizioni un' azione protettiva abbastanza netta. Così il siero dell'asino 4 salvò la cavia alle dosi impiegate di 2-1 e ½ cmc., con una sola eccezione; il siero dell' asino 5 si mostrò sempre efficace alla dose di 2 cmc., spesso bastò anche 1 solo cmc. a proteggere la cavia, mentre la dose di ½ cmc. apparve insufficiente; il siero dell'asino 6, infine, si mostrò attivo alle dosi usate, mentre il siero Berna, che già erasi mostrato inefficace contro il nostro vaccino, non valse che a ritardare tutt'al più la morte. Similmente il siero anticarbonchioso di cavallo spiegò un'azione protettiva evidente, mentre invece fu irregolare l'andamento delle titolazioni eseguite col siero anticarbonchioso di pecora e il miscuglio dei sieri di vacca, pecora e cavallo, alle dosi usate, non fece che ritardare la morte. Se si confrontano poi i risultati sopra esposti con quelli ottenuti coi diversi sieri contro il nostro vaccino (cfr. le tabelle III, VI e IX), si ha l'impressione che ad ottenere mediante i sieri anticarbonchiosi di asino e di cavallo un'azione protettiva contro il bacillo Pasteur, bastano dosi minori, forse circa la metà, di quelle necessarie per proteggere contro il nostro vaccino.

Dalle esperienze riportate in fondo alla tavola finalmente resta confermato che, sostituendo all'iniezione intraperitoneale quella sottocutanea di siero, il siero anticarbonchioso di asino anche contro il vaccino Pasteur non dà risultati regolari che quando l'intervallo fra le due iniezioni è portato a 3 volte 24 ore.

***

Le nostre ricerche dunque dimostrano ad evidenza, che il siero anticarbonchioso è in grado di esplicare in determinate condizioni un' azione protettiva nella cavia contro le colture di una virulenza come quella dei vaccini anticarbonchiosi, ma non contro ceppi più virulenti. Esse ci additano inoltre la causa dei risultati contradditori ottenuti specialmente dall' Ottolenghi nel laboratorio dello Sclavo da un lato, dallo Schubert nell' istituto di Ehrlich dall'altra. Mentre l'Ottolenghi valendosi a preferenza dei vaccini Pasteur riusciva col siero a salvare le cavie e, in base a tre esperienze con carbonchio non attenuato, riteneva che il siero fosse efficace anche contro quest' ultimo; lo Schubert invece, servendosi di un ceppo virulento, soltanto a tutta prima, otteneva risultati buoni, ma moltiplicando le esperienze si persua-

deva della loro incostanza e irregolarità. La causa di tali contraddizioni andrebbe in base ai nostri studi ricercata appunto principalmente nella virulenza del ceppo, contro il quale si voleva difendere la cavia: l'immunizzazione si otterrebbe secondo noi con una certa costanza soltanto contro ceppi di una virulenza determinata, come quella dei vaccini.

Per ciò che riguarda il ceppo impiegato nei nostri dosaggi noi abbiamo preferito il nostro ceppo a quello di Pasteur perchè la sua virulenza ci si è dimostrata più costante e più facile a conservarsi che non quella dei tipi pasteuriani.

Il quantitativo di siero necessario per ottenere un'immunizzazione passiva contro il nostro ceppo si aggira intorno ai 2 cmc. per i sieri di mediocre attività, ma può scendere a 1 cmc. e anche meno per quelli molto attivi.

Interessanti da un punto di vista teorico, specialmente per il riassorbimento del siero e lo svolgersi dell'immunità, sono le osservazioni risguardanti gli intervalli tra l'iniezione del siero e della coltura, dalle quali si desume che *l'immunità impiega un tempo diverso a stabilirsi, secondo che l'iniezione si faccia nel peritoneo o nel sottocutaneo.*

Da un punto di vista pratico esse parlano a favore dell'iniezione endovenosa consigliata dallo Sclavo, poichè, portando il siero direttamente nel circolo, si stabilisce tosto quell'immunità, che dal sottocutaneo è più lenta a svolgersi.

Per la pratica delle titolazioni noi crediamo di poter consigliare l'iniezione peritoneale del siero seguita dopo 24 ore dall'iniezione sottocutanea alla spalla di $\frac{1}{4}$ di cmc. di una coltura in brodo di 24 ore del nostro vaccino, usando cavie intorno ai 300 grammi, le quali vanno tenute in osservazione una settimana. Se le nostre ricerche saranno confermate, come spero, da altra parte, si potrà adottare questo metodo per il dosaggio del siero anticarbonchioso, stabilendo norme precise per il controllo del suo valore, per troncare le incertezze, che attualmente rendono dubbiosi gli istituti produttori e quelli di controllo, e per garantire al consumatore lo smercio di siero ad alto valore: in tal modo la sieroterapia anticarbonchiosa potrà poggiare su basi sperimentali più ampie e sarà più accessibile, tolti di mezzo gli insuccessi dovuti a sieri di poco valore, ad un sereno apprezzamento.

Volendo riassumere brevemente le principali risultanze emerse dalle mie esperienze, si possono formulare le seguenti conclusioni:

1° *L'iniezione endovenosa di siero anticarbonchioso conferisce al coniglio un'immunizzazione passiva più o meno evidente a secondo della*

virulenza dei ceppi, contro i quali si vuol proteggere l'animale, ma i risultati che si ottengono facendo seguire l'inoculazione dei varî ceppi alla dose di 1-2 anse 24 ore dopo il siero non sono abbastanza regolari per consentire un dosaggio del suo valore.

2° *Il siero anticarbonchioso è in grado di esplicare in determinate condizioni un' azione protettiva nella cavia soltanto contro colture di una virulenza come quella dei vaccini, ma non contro ceppi virulenti.*

3° *L' immunità passiva da siero anticarbonchioso nella cavia compare regolarmente già dopo 24 ore, se il siero è iniettato nel peritoneo. e appena dopo 3 × 24 ore, se si pratica sottocute.*

4° *Le dosi di siero necessarie per ottenere l' immunità nella cavia sono diverse a seconda dei ceppi contro i quali si vuol difenderla, ma prendendo per base un ceppo di una determinata virulenza si può dosare comparativamente il valore dei diversi sieri.*

Tabella I.

Iniezione endoperitoneale del siero. — Iniezione sottocutanea della coltura.
Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Quantità di siero iniettata = 2 cmc.

Peso — gm.	Siero usato	Coltura usata	Esito — giorni	Reperto necroscopico	
330	asino 6 (anticarbonchioso fenicato al 0.4%)	Bruzzano ¼ cmc. coltura in brodo di 20 ore	+ 1 ⅓	anatomico / colturale	carbonchio
340	id.	id.	+ 2 ⅓	id.	id.
340	id.	id.	id.	id.	id.
350	id.	id.	+ 1 ⅓	id.	id.
350	id.	id.	id.	id.	id.
330	id.	id.	+ 2 ⅓	id.	id.
280	controllo	id.	+ 1 ¼	id.	id.
270	id.	id.	id.	id.	id.
320	asino 4 (anticarbonchioso non fenicato)	Merck ¼ cmc. coltura in brodo di 20 ore	+ 3 ⅓	id.	id.
310	id.	id.	+ 4 ⅓	id.	id.
380	id.	id.	+ 5	id.	id.
340	id.	id.	+ 5 ½	id.	id.
300	id.	id.	+ 9 ⅓	id.	id.
350	id.	id.	+ 10	id.	id.
300	controllo	id.	+ 1 ²/₃	id.	id.
320	id.	id.	id.	id.	id.
330	asino 4 (anticarbonchioso non fenicato).	Asc. ¼ cmc. coltura in brodo di 20 ore	+ 3 ½	id.	id.
300	id.	id.	+ 4	id.	id.
330	id.	id.	+ 4 ⅓	id.	id.

Segue Tabella I.

Peso — gm.	Siero usato	Coltura usata	Esito — giorni	Reperto necroscopico	
300	asino 4 (anticarbonchioso non fenicato)	Asc. ¼ cmc. coltura in brodo di 20 ore	+ 5 ³/₄	anatomico / colturale	carbonchio
310	id.	id.	+ 10 ²/₃	id.	id.
280	id.	id.	vive		
300	controllo	id.	+ 1 ¼	anatomico / colturale	dubbio
300	id.	id.	+ 2 ¼	anatomico / colturale	carbonchio
280	asino 4 (anticarbonchioso non fenicato)	Vaccino nostro ¼ cmc. coltura in brodo di 20 ore	vive		
350	id.	id.	id.		
280	id.	id.	id.		
330	id.	id.	+ 8 ⅓	id.	id.
360	asino 6 (anticarbonchioso fenicato)	id.	vive		
310	id.	id.	id.		
340	id.	id.	id.		
310	id.	id.	id.		
310	id.	id.	id.		
300	id.	id.	+ 6	id.	id.
310	id.	id.	vive		
310	id.	id.	id.		
310	id.	id.	id.		
300	controllo	id.	+ 2 ⅓	id.	id.
330	id.	id.	id.	id.	id.

TABELLA II.

Iniezione endoperitoneale del siero. — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso gm.	Siero di capra		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità cmc.		
310	7 agosto	4	vive	
300	id.	2	+ in 12 ore	anatomico, colturale: non carbonchioso
300	id.	1	vive	
310	id.	0.5	id.	
400	26 settembre	4	+ in ore 5 3/4	carbonchio
400	id.	2	+ in ore 3 ½	id.
420	id.	1	+ in ore 2 ½	id.
480	id.	0.5	+ in ore 2 3/4	id.
310	14 ottobre	4	vive	
300	id.	2.5	id.	
330	id.	1	id.	
470	id.	0.5	+ in 4 ore	id.
400	id.	0.5	+ in 5 ore	id.
470	id.	0.25	id.	id.

TABELLA III.

Iniezione endoperitoneale del siero. — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso — gm.	Siero asino n. 3		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
410	25 luglio	4	vive	
350	id.	4	id.	
420	id.	4	id.	
360	id.	4	ld.	
350	7 agosto	4	id.	
350	id.	2	id.	
350	id.	1	id.	
360	id.	½	id.	
340	26 settembre	2	id.	
340	id.	1	+ 3 ²/₃	carbonchio
380	id.	1	+ 4 ⅓	id.
450	id.	1.5	+ 5 ³/₄	id.
300	11 ottobre	2	vive	
300	30 ottobre	2.3	id.	
360	id.	2	id.	
370	id.	2	id.	
300	id.	1	id.	
340	id.	1	id.	
280	3 gennaio 1906	2	..	anatomico, colturale: non carbonchioso
270	id.	2	vive	
270	id.	2	+ 5 ³/₄	anatomico, colturale: carbonchioso
470	10 gennaio 1906	2	vive	
330	id.	2	id.	

Segue TABELLA III.

Peso — gm.	Siero asino n. 3 — Epoca del salasso	Siero asino n. 3 — Quantità — cmc.	Esito	Reperto necroscopico
310	10 gennaio 1906	2	vive	
300	id.	2	id.	
470	id.	3	id.	
360	15 gennaio 1906	2	id.	
290	id.	2	id.	
290	8 febbraio 1906	2	id.	
270	id.	1.5	id.	
300	id.	1	id.	

TABELLA IV.

Iniezione endoperitoneale del siero — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso — gm.	Siero asino n. 4 — Epoca del salasso	Siero asino n. 4 — Quantità — cmc.	Esito	Reperto necroscopico
350	4 maggio	2	vive	
280	id.	2	id.	
330	id.	2	+ 8 1/3	carbonchio
330	7 luglio	3	+ 11 1/3	anatomico, colturale: non carbonchioso
400	id.	2	+ 8 1/3	anatomico, colturale: carbonchio
380	id.	1	+ 4 3/4	id.
330	7 agosto	4	vive	
320	id.	2	id.	
370	id.	1	+ 7 1/3	anatomico, microscopico: carbonchio

Segue TABELLA IV.

Peso — km.	Siero asino n. 4		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
330	7 agosto	0.5	+ 4 ½	anatomico / microscopico } carbonchio
320	15 settembre	2	vive	
300	id.	2	id.	
310	id.	1	id.	
320	id.	1	+ 3 ½	carbonchio
300	id.	0.5	+ 2 3/4	id.
300	11 ottobre	2	vive	
300	id.	2	id.	
310	id.	1	id.	
300	id.	1	id.	
300	id.	0.5	+ 4 ½	
500	27 ottobre	2	+ 7 1/3	carbonchio
280	id.	1	vive	
340	10 novembre	2	id.	
330	id.	1	+ 6	carbonchio
380	13 novembre	2	+ 9 ½	id.
330	id.	1	+ 9 1/3	id.
280	10 novembre (fenicato)	1	vive	
260	id.	2	id.	
290	id.	2	id.	
280	id.	1	id.	
290	3 gennaio 1906	2	id.	
290	id.	2	id.	
270	id.	2	+ 10 ½	carbonchio
300	8 febbraio 1906	2	vive	
280	id.	1.5	id.	
300	id.	1.0	id.	

Tabella V.

Iniezione endoperitoneale del siero. — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni 24 ore.

Peso — gm.	Siero asino n. 5		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
350	7 agosto	4	vive	
330	id.	2	+ 3 ½	anatomico colturale carbonchio
340	id.	1	+ 3 ¾	id. id.
320	id.	0.5	+ 3 ½	id. id.
400	26 settembre	2	+ 4 ⅓	carbonchio
400	id.	1	+ 3 ⅔	id.
400	6 ottobre	2	+ 4 ⅓	id.
400	id.	1	+ 4 ⅓	id.
400	id.	4	vive	
380	id.	4	+ 3 ½	id.
450	id.	3	+ 4 ½	id.
380	id.	3	+ 2 ¾	id.
300	27 ottobre	2	vive	
300	id.	1	+ 7 ¾	id.
340	6 novembre	2	vive	
290	id.	2	id.	
280	id.	1	+ 3 ⅓	id.
270	id.	1	+ 4 ⅓	id.

Segue TABELLA V.

Peso — gm.	Siero asino n. 5		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
350	13 novembre	2	vive	
280	id.	1	+ 3 ½	carbonchio
290	15 novembre (fenicato)	2	+ 3 ⅓	id.
340	id.	1	+ 4 ²/₃	id.
270	id.	2	vive	
280	id.	2	+ 5 ⅓	id.
270	id.	1	+ 4	id.
280	3 gennaio 1906	2	+ 3 ⅓	id.
290	id.	2	id.	id.
320	15 gennaio 1906	2	+ 3	id.
290	id.	2	vive	
330	27 gennaio 1906	2	+ 12 ²/₃	id.
330	id.	2	+ 3 ²/₃	id.
300	id.	2	vive	
300	id.	2	+ 4 ⅓	id.
260	id.	1.5	+ 5 ⅓	id.

TABELLA VI.

Iniezione endoperitoneale del siero — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso — gm.	Siero asino n. 6		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
360	25 luglio	4	+ 4 ½	anatomico, colturale: carbonchio
400	id.	4	+ 3 ½	id. id.
400	id.	4	+ 3 ½	anatomico, microscopico, colturale: carbonchio
350	id.	4	vive	
320	7 agosto	4	+ 5	reperto carbonchioso
370	id.	2	+ 5 ½	anatomico, colturale: carbonchio
370	id.	1	+ 5	reperto carbonchioso
350	id.	0.5	+ 4 $^{2}/_{3}$	anatomico, colturale: carbonchio
400	26 settembre	4	+ 3 ½	carbonchio
360	id.	2	+ 4 ⅓	id.
370	6 novembre	2	vive	
290	id.	2	id.	
280	id.	1	id.	
280	id.	1	id.	
380	13 novembre	1	id.	
430	id.	1	id.	
450	id.	0.5	+ 6 $^{2}/_{3}$	carbonchio

Segue TABELLA VI.

Peso — gm.	Siero asino n. 6		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
470	13 novembre	1.5	vive	
270	22 novembre	2	id.	
270	id.	1	+ 8 $^2/_3$	anatomico: carbonchio colturale: infez. mista
260	23 novembre	2	+ 3 ⅓	anatomico: dubbio colturale: carbonchio
260	id.	1	vive	
270	id.	0.5	id.	
360	id.	2 (fenicato)	id.	
310	id.	id.	id.	
340	id.	id.	id.	
310	id.	id.	id.	
310	id.	id.	id.	
300	id.	id.	+ 6	anatomico } carbonchio colturale }
310	id.	id.	vive	
310	id.	id.	id.	
310	id.	id.	id.	

Tabella VII.

Iniezione endoperitoneale del siero — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso — gm.	Siero asino n. 1 *bis*		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
300	13 novembre 1905	4	+ 2 ½	carbonchio
270	id.	2	+ 1 ⅔	id.
300	3 gennaio 1906	2	+ 3 ⅓	id.
340	id.	2	+ 2 ⅓	id.
270	27 gennaio 1906	2	vive	
280	id.	2	vive	
260	id.	1.5	vive	
310	id.	1.5	vive	
260	id.	1.8	vive	
290	8 febbraio 1906	2	vive	
310	id.	1	vive	

TABELLA VIII.

Iniezione endoperitoneale del siero — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso — gm.	Siero asino n. 2		Esito	Reperto necroscopico
	Epoca del salasso	Quantità — cmc.		
370	13 novembre	4	+ 3	carbonchio
420	id.	2	+ 3 3/4	id.
300	id.	4	+ 2 1/3	id.
270	id.	2	+ 2 2/3	id.
270	3 gennaio	2	+ 4 1/3	id.
320	id.	2	+ 2 1/2	id.
310	27 gennaio	4	+ 2 2/3	id.
270	8 febbraio	4	+ 3 1/2	id.
300	id.	2	+ 2	id.
500	3 marzo	4	vive	
270	id.	2	id.	
530	id.	2	+ 6 1/2	carbonchio
260	id.	3	vive	
270	12 marzo	2	id.	
270	id.	2	id.	
270	id.	2	+ 4 1/2	anatomico, microscopico: nulla; colturale: carbonchio
270	id.	2	vive	

TABELLA IX.

Iniezione endoperitoneale del siero — Iniezione sottocutanea della coltura (vaccino N) — Intervallo tra le due iniezioni: 24 ore.

Peso — gm.	Siero anticarbonchioso		Esito	Reperto necroscopico
	Qualità	Quantità — cmc.		
350	miscuglio: siero asino 3 e asino 4	4	vive	
350	id.	4	id.	
350	id.	4	id.	
350	id.	4	id.	
370	siero Sclavo	2.5	+ 5 ½	carbonchio
320	id.	2	vive	
480	id.	2	id.	
290	id.	1	id.	
290	id.	1	+ 5 ⅓	carbonchio
470	id.	0.5	+ 2 ²/₃	id.
270	siero Deutsch	2	vive	
270	id.	0.5	+ 3 ⅓	carbonchio
280	id.	1	+ 5 ⅓	id.
270	siero Berna	2	+ 4 ⅓	id.
300	id.	1.5	+ 4 ⅓	id.
260	id.	1	+ 2 ½	id.
280	siero Sobernheim I	2	vive	
260	id.	2	id.	

Segue TABELLA IX.

Peso — gm.	Siero anticarbonchioso — Qualità	Siero anticarbonchioso — Quantità — cmc.	Esito	Reperto necroscopico
330	siero Sobernhe m I	1	vive	
260	id.	1	+ 2 $^{2}/_{3}$	carbonchio
260	siero Sobernheim II	2	vive	
270	id.	2	id.	
260	id.	1	+ 9 $^{3}/_{4}$	carbonchio
320	id.	1	+ 5 $^{2}/$	id.
420	siero Sobernheim III	2	vive	
300	id.	2	id.	
290	id.	1	+ 7 $^{3}/_{4}$	carbonchio
360	id.	1	+ 5	id.
260	siero Sobernheim I	2	vive	
270	id.	1.25	+ 5 $^{2}/_{3}$	carbonchio
260	id.	1	+ 3 $^{1}/_{3}$	id.
260	siero Sobernheim II	2	vive	
260	id.	1.5	id.	
260	siero Sobernheim III	2	id.	
260	id.	1.5	id.	
260	id.	1	+ 3 $^{1}/_{3}$	carbonchio

TABELLA X.

Iniezione sottocutanea del siero — Iniezione sottocutanea della coltura.
Coltura usata = 1/4 cmc. di coltura in brodo di 24 ore del nostro vaccino.

Peso — gm.	Siero usato — Qualità	Siero usato — Quantità — cmc.	Intervallo tra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
510	asino 3 salasso 21 ottob.	1	0 ore	+ 5 1/3	carbonchio
520	id.	0.5	id.	+ 4 1/3	id.
300	asino 5 salasso 21 ottob.	2	id.	+ 3 1/3	id.
320	id.	1	id.	id.	id.
300	asino 3 salasso 11 ottob.	2	24 ore	vive	
300	id.	1	id.	+ 4 1/2	id.
310	capra salasso 14 ottob.	id.	id.	+ 7	non carbonchioso agar cuore: sterile
430	id.	id.	id.	+ 6 1/2	carbonchio
400	id.	0.5	id.	vive	
380	id.	id.	id.	+ 5 1/2	id.
430	id.	0.25	id.	+ 4 1/2	id.
300	asino 5 salasso 21 ottob.	2	id.	+ 4 1/3	id.
300	asino 3 salasso 21 ottob.	1	id.	vive	
300	siero Sclavo	3	id.	+ 2 1/3	id.
310	id.	2	id.	+ 5 1/3	id.
300	id.	id.	id.	+ 3 2/3	id.
410	id.	1	id.	+ 3 1/3	id.

Segue TABELLA X.

Peso — gm.	Siero usato		Intervallo tra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
	Qualità	Quantità — cmc.			
310	siero Sclavo	1	24 ore	vive	
300	id.	0.5	id.	+ 2 $^2/_3$	carbonchio
500	asino 3 salasso 21 ottob.	1	id.	vive	
500	id.	0.5	id.	+ 4 $^1/_3$	id.
330	asino 5 salasso 21 ottob.	2	id.	+ 3 $^1/_3$	id.
280	id.	1	id.	id.	id.
270	asino 4 salasso 6 novem.	2	48 ore	vive	
280	id.	id.	id.	+ 4 $^1/_2$	id.
300	id.	1	id.	+ 4 $^3/_4$	id.
260	id.	id.	id.	id.	id.
280	asino 3 salasso 21 ottob.	4	3 × 24 ore	vive	
270	id.	2	id.	id.	
300	id.	id.	id.	id.	
290	id.	1	id.	id.	
440	id.	id.	id.	+ 7 $^1/_2$	anatomico, colturale } carbonchio
270	id.	0.5	id.	+ 3 $^1/_2$	id.
280	asino 6 salasso 6 novem.	2	id.	vive	
280	id.	id.	id.	id.	

Segue TABELLA X.

Peso — gm.	Siero usato		Intervallo tra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
	Qualità	Quantità — cmc			
390	asino 6 salasso 6 novem.	1	3 × 24 ore	vive	
290	id.	id.	id.	id.	
370	asino 3 (fenicato)	id.	id.	vive	
260	id.	id.	id.	+ 8 ½	anatomico: dubbio colturale: infezione mista
260	id.	1	id.	vive	
280	id.	0.5	id.	+ 3 ½	carbonchio
280	asino 5 (fenicato)	2	id.	+ 4 ²/₃	id.
260	siero Deutsch	id.	id.	+ 5 ⅓	id.
260	siero Sob. 1	id.	id.	+ 4 ⅓	id.
260	siero Sob. 2	id.	id.	vive	
310	siero Sob. 3	id.	id.	+ 4	id.
280	siero asino 4 (fenicato)	id.	id.	vive	
290	siero Sob. 1	id.	id.	+ 4 ⅓	id.
260	id.	id.	id.	+ 2 ⅓	id.
310	id.	1	id.	+ 4 ⅓	id.
280	id.	id.	id.	+ 3 ⅓	id.
290	siero Sob. 2	2	id.	vive	
290	id.	id.	id.	id.	

Segue TABELLA X.

Peso — gm.	Siero usato: Qualità	Siero usato: Quantità — cmc.	Intervallo tra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
280	siero Sob. 2	1	3 × 24 ore	vive	
280	id.	id.	id.	+ 6 ⅓	carbonchio
270	siero Sob. 3	2	id.	vive	
270	id.	id.	id.	+ 5 ⅓	id.
260	id.	1	id.	id.	id.
280	id.	id.	id.	+ 7 ⅓	id.
380	asino 6	4	id.	vive	
260	siero Deutsch	id.	id.	id.	
260	id.	2	id.	id.	
260	id.	1.5	id.	id.	
270	id.	1	id.	id.	
400	asino 6	4	id.	id.	
440	id.	3	id.	+ 6 ⅓	Infezione mista
370	asino 5	4	id.	+ 3 ⅓	carbonchio
280	id.	2.5	id.	+ 6 ⅓	id.
270	siero Berna	4	id.	+ 3 ⅓	id.
260	id.	2	id.	id.	id.
260	id.	id.	id.	id.	id.
260	asino 5	6	4 × 24 ore	+ 4 ⅓	id.
280	asino 3 salasso 21 ottob.	4	5 × 24 ore	vive	id.
330	id.	2	id.	+ 3 ⅓	id.
280	id.	1	id.	+ 4 3/4	id.

Tabella XI.

Esperienze con primo vaccino Pasteur.

Peso — gm.	Siero usato		Modo d' iniezione del siero	Intervallo fra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
	Qualità	Quantità — cmc.				
300	asino 4 salasso 6 nov.	2	endoperitoneale	24 ore	vive	
270	id.	2	id.	id.	id.	
290	id.	1	id.	id.	id.	
290	id.	1	id.	id.	id.	
260	id.	0.5	id.	id.	id.	
280	asino 5 salasso 13 nov.	1	id.	id.	vive	
280	id.	0.5	id.	id.	+ 3 ⅓	carbonchio
300	asino 6 salasso 13 nov.	1	id.	id.	vive	id.
290	id.	0.5	id.	id.	id.	id.
270	siero Berna	2	id.	id.	+ 6 ½	id.
270	id.	1	id.	id.	+ 4 ⅓	id.
280	id.	0.5	id.	id.	+ 2 ½	id.
270	siero Deutsch	2	id.	id.	vive	
290	siero Deutsch	1	endoperitoneale	24 ore	vive	
310	id.	0.5	id.	id.	+ 6 ½	id.
280	siero Sob. I	1	id.	id.	+ 6	id.
280	id.	0.5	id.	id.	+ 4 ⅓	id.
280	siero Sob. II	1	id.	id.	vive	

Segue TABELLA XI.

Peso — gm.	Siero usato		Modo d' iniezione del siero	Intervallo fra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
	Qualità	Quantità — cmc.				
320	siero Sob. II	0.5	id.	id.	+ 6 2/3	carbonchio
280	siero Sob. III	1	id.	id.	+ 6	id.
280	id.	0.5	id.	id.	vive	id.
300	asino 5 (fenicato)	1	id.	id.	+ 3 3/4	carbonchio
340	id.	0.5	id.	id.	+ 4 ½	
330	asino 4 (fenicato)	1	id.	id.	vive	
260	id.	0.5	id.	id.	id.	
260	asino 6	1	id.	id.	id.	
295	asino 5 (fenicato)	2	endoperitoneale	24 ore	vive	
260	id.	1	id.	id.	id.	
270	id.	1	id.	id.	id.	
280	asino 4 (fenicato)	2	id.	id.	id.	
270	id.	1	id.	id.	id.	
290	id.	1	id.	id.	+ 6 ½	anatomico } colturale } nulla
410	asino 5 (fenicato)	2	id.	id.	vive	
260	id.	2	id.	id.	id.	
280	id.	1	id.	id.	id.	
370	id.	1	id.	id.	+ 5	carbonchio

Segue TABELLA XI.

Peso — gm.	Siero usato Qualità	 Quantità — cmc.	Modo d' iniezione del siero	Intervallo fra le due iniezioni	Esito	Reperto necroscopico
350	asino 4 (fenicato)	2	endoperitoneale	24 ore	vive	
260	id.	2	id.	id.	id.	
290	id.	1	id.	id.	id.	
300	id.	1	id.	id.	id.	
280	asino 5 salasso 21 ott.	4	sottocute	id.	+ 4	carbonchio
280	id.	2	id.	id.	vive	
280	asino 3 salasso 21 ott.	4	id.	id.	+ 12	carbonchio
300	id.	2	id.	3×24 ore	vive	
310	asino 4 salasso 6 nov.	2	id.	id.	id.	
290	id.	2	id.	id.	id.	
280	id.	1	id.	id.	id.	
290	id.	1	id.	id.	id.	
280	id.	0.5	id.	id.	id.	
310	asino 6 salasso 6 nov.	2	id.	id.	vive	
320	id.	1	id.	id.	id.	
330	id.	0.5	id.	id.	id.	

LETTERATURA.

1. SCLAVO. *Sulla preparazione del siero anticarbonchioso.* X Congresso di medicina interna. Seduta del 22 ottobre. Roma, 1895.

2. MARCHOUX. *Sérum anticharbonneux.* Annales de l'Institut Pasteur, Tome IX, n. 11, 1895.

3. SCLAVO. *Sulla preparazione del siero anticarbonchioso.* (Memoria 2ª). Rivista d'Igiene e Sanità Pubblica, Anno VII, 18–19, 1896.

4. SOBERNHEIM. *Experimentelle Untersuchungen zur Frage der aktiven und passiven Milzbrandimmunität.* Zeitschrift f. Hygiene, Bd. XXV, 1897.

5. SAWTCHENKO. *Contribution à l' étude de l'immunité.* Annales de l'Institut Pasteur, Tome XI, 1897.

6. SOBERNHEIM. *Weitere Untersuchungen ueber Milzbrandimmunität.* Zeitschrift f. Hygiene, Bd. XXXI, 1899. Deutsche mediz. Wochenschrift. 1904, n. 26-27.

7. SCLAVO. *Neue experimentelle Untersuchungen ueber die Heilwirkung des Milzbrandserums.* Berl. klinische Woch., 1901, n. 18–19. *Nuove ricerche sperimentali sul potere curativo del siero anticarbonchioso.* Riv. d'Igiene e Sanità pubblica, Anno XII, n. 6–7, 1901.

8. SANFELICE. *Untersuchungen ueber die Wirksamkeit des Milzbrandserums des Hundes als Schutz- und Heilmittel.* Centralbl. f. Bakteriologie I. A. Bd. XXXIII, Originale 1903.

9. MENDEZ J. *Das Serum gegen den Milzbrand.* Centralbl. f. Bakteriologie 1 A. Bd. XXVI, 1899.

10. OTTOLENGHI. *Sul carbonchio sperimentale nelle cavie e sul valore protettivo del siero Sclavo contro tale infezione.* Atti R. Accad. dei Fisiocritici, Serie IV, Vol. XIV, 1902.

11. SCHUBERT. *Versuche ueber die Wertbemessung des Sobernheim'schen Milzbrandserums.* I. D. Giessen, 1903.

12. SOBERNHEIM. *Ueber das Milzbrandserum und seine praktische Anwendung.* Deutsche mediz. Wochenschr. 1904, n. 26-27.

13. SCLAVO. *Sullo stato presente della Sieroterapia anticarbonchiosa.* Atti R. Accademia dei Fisiocritici, S. IV, Vol. XV, 1903.

14. BAIL. *Untersuchungen ueber natuerliche und kuenstliche Milzbrandimmunität.* Centralbl. f. Bakteriologie, Bd. XXXVI, 1904.

15. DEUTSCH in DEUTSCH e FEISTMANTEL. *Vaccini e Sieri.* Traduz. BELFANTI e ASCOLI. Torino, Rosenberg e Sellier, pag. 246.

Istituto d'Igiene della R. Università di Pisa.

Sui microrganismi produttori dei tubercoli radicali delle leguminose.

Ricerche del dott. **GINO DE' ROSSI,** aiuto e libero docente
(con la tav. XI).

1. Cenni storico-bibliografici sulla quistione della fissazione dell'azoto atmosferico da parte delle papilionacee, in rapporto colla presenza dei tubercoli radicali.

Nella complessa questione dell'assorbimento dell'azoto atmosferico da parte del suolo e dei vegetali, il cui altissimo interesse scientifico e pratico ha richiamato da gran tempo l'attenzione di numerosissimi studiosi, l'argomento che forse ha dato luogo finora al maggior numero di ricerche e di discussioni è quello dell'utilizzazione dell'azoto atmosferico da parte delle leguminose.

Il fatto, fino da tempo antichissimo nel dominio delle cognizioni comuni (tanto che già è ricordato da Plinio (1) e da Varro (2), che la cultura delle leguminose rende il terreno più fertile per le successive coltivazioni, sembra sia stato da Thaer (3) per il primo messo in rapporto con la presenza di sostanze azotate formate dalle leguminose a spese dell'azoto dell'aria, e da queste poi abbandonate nel suolo con le radici e gli altri residui. E le successive ricerche di Boussingault (4), Gilbert Lawes e Pough (5) Ville (6), Schultz-Lupitz (7) ed altri, confermarono che mentre i cereali diminuiscono il contenuto di sostanze azotate del terreno, le leguminose invece lo rendono maggiore. Finalmente, mentre il Berthelot (8) con le sue classiche esperienze dimostrava la fissazione dell'azoto da parte della terra vegetale, Hellriegel (9) nel 1886 riferiva il risultato delle sue ricerche, da lui poi continuate in collaborazione col Willfahrt (10), che stabilivano su una base veramente scientifica la quistione dell'utilizzazione dell'azoto atmosfe-

rico da parte delle papilionacee, dimostrando per mezzo di esperimenti di coltivazione su terreni privi di azoto, sterilizzati e successivamente infettati con diluizioni di terra prelevata da campi coltivati a leguminose, i seguenti fatti fondamentali:

l'azoto atmosferico basta a dar luogo a uno sviluppo normale delle leguminose;

i tubercoli che esse portano sulle loro radici sono in relazione diretta con questa assimilazione di azoto;

si può provocare la comparsa di questi tubercoli, e lo sviluppo rigoglioso delle leguminose in terreni privi di azoto, aggiungendo a questi una piccola quantità di un infuso di terreno coltivato a leguminose;

tuttociò non si verifica, se coll'ebullizione del materiale d'innesto si uccidono i microrganismi.

Finalmente H. e W. interpetrano questi fatti come il risultato di una simbiosi tra le papilionacee ed alcuni microrganismi specifici.

Ad onta di qualche voce discorde (cito come la più autorevole quella del Frank, che in una lunga serie di memorie (11-19) tentò di negare la funzione fissatrice di azoto delle leguminose, attribuendola esclusivamente alle alghe del suolo, ed in genere a tutti i vegetali sprovvisti di clorofilla), i fatti stabiliti da H. e W. ricevettero piena conferma dagli ulteriori studi di Lawes e Gilbert (20), di Petermann (21), di Atwater e Wood (22) e specialmente dalle ricerche di Schloesing e Laurent (23), i quali riuscirono a dosare con notevole esattezza la quantità di azoto libero atmosferico fissato da piante di leguminose (piselli) nel periodo del loro sviluppo.

Tutti questi A.A. confermarono il rapporto diretto stabilito da Hellriegel (e già da qualcuno precedentemente intraveduto) tra la fissazione dell'azoto e la presenza sulle radici delle papilionacee di speciali nodosità, i cosidetti tubercoli, la cui natura e funzione avevano per l'addietro dato luogo alle più strane e svariate interpretazioni. Ricordo a tale proposito che, secondo Mattirolo (24), Delechamps (25) fu il primo che nel 1586 ricordò i tubercoli delle leguminose: successivamente il nostro Malpighi (26) nel 1687 ne dà un'accurata descrizione, interpretandoli come galle d'insetti. K. v. Wulffen (27), De Candolle (28), Trinchinetti (29), Persoon e Fries (30), Clos (31), Gasparrini (32), Trevisanus (33), Kolaczek (34) e molti altri descrissero successivamente tali formazioni considerandole o come effetto di arresto di sviluppo, o di sviluppo abnorme di elementi normali della radice o come galle, o come sclerozii, o come prodotti di parassiti, i più varii. Lachmann (35) nel 1858 dimostrò che la presenza dei tubercoli deve considerarsi come un carattere proprio delle papilionacee, e già li mise in rapporto col potere fertilizzante di questi vegetali; a conclusioni uguali giunsero poco dopo Rautemberg e Kuhn (36) e Woronin (37) che nel 1886 dette la prima accurata descrizione della fina struttura dei tubercoli, ed emise l'opinione che essi fossero formati da esseri microscopici che egli considerava come batteri. Successivamente, i tubercoli furono segnalati e descritti in tutte o quasi tutte le papilionacee anche esotiche, e numerosissimi furono gli studi circa la loro struttura e il loro modo di comportarsi di fronte alle varie influenze fisiche e chimiche dell'ambiente (Cf. oltre alle altre citate altrove, le memorie di Lecomte (38), Kirschner (39), Clos (40-41), Thiel (42), Jonse (43), Mottareale (44), Paratore (45-47), Dawson (48), Belison (49), Life (50),

Gross (51), Laurent (52), Marchal (53), Trotter (54), ecc). *a*) La teoria della loro origine parassitaria emessa dal Woronin. (37) ebbe contraddittori autorevoli quali De Vries (59), Brunchorst (60), Frank (61-62), Schindler (63), Tschirch (64), Strecker (65), Benecke (66), Mattirolo (67), Buscaglioni (68), Vuillemin (69), Van Tieghem e Douliot (70), Lundstroem (71), Arcangeli (72), Delpino (73) che escludono in modo più o meno reciso la natura microbica dei corpuscoli osservati nei tubercoli delle leguminose, ritenendoli invece come speciali differenziazioni del plasma cellulare e considerando i tubercoli stessi come organi normali di assunzione delle materie azotate del terreno, o come organi di riserva. Fu invece sostenuta tra molti altri, da Erikson (74), da Cornu (75), Prillieux (76), Kny (77), Schindler (78) che per il primo emise l'ipotesi di una simbiosi tra la pianta e il microrganismo annidato nelle sue radici), finchè a tagliar corto con tali incertezze, non giunsero le ricordate ricerche di Hellriegel e Willfahrt (9-10), e degli altri citati autori, nonchè quelle di Prazmowski (79), Bejerinck (55-80), Ward (81), Breal (82), Kossowitsch (83) Wagner, (84), Hellriegel (85), Willfahrt (86), a dimostrare che *la fissazione dell'azoto da parte delle leguminose è un fatto legato alla presenza dei tubercoli i quali non si osservano mai nelle piante vegetanti in terreni mantenuti sterili, e che i corpuscoli contenuti nell'interno dei tubercolo devono considerarsi come veri e propri microrganismi, passati dal terreni nelle radici, ed appartenenti probabilmente alla classe dei batteri.*

2. — I microrganismi finora isolati dai tubercoli radicali delle leguminose: la Pseudomonas radicicola Bejerinck.

Stabilita così la conoscenza della funzione dei noduli radicali, e riconosciutane la causa nello sviluppo di speciali microrganismi, lo studio di essi fu, naturalmente, oggetto di numerose ricerche. Già Prillieux (76) aveva mostrato come i microrganismi del suolo diano luogo alla infezione delle giovani radici, al momento dello sviluppo dei peli radicali. In una sezione di un giovane tubercolo si osservano filamenti simili ad ifi che attraversando i peli radicali penetrano nel tessuto sottoepidermico della radice: questi filamenti, che secondo P. apparterrebbero ad un fungo vicino ai mixomiceti, darebbero luogo all'infezione della radice e quindi alla produzione del tubercolo; e nell'interno di questo, scindendosi e trasformandosi darebbero luogo al tessuto centrale composto dei caratteristici corpuscoli variamente conformati, più o meno incurvati, o rigonfi, a forma di T, di X o di Y, la cui natura era stata così variamente interpretata e che già da Brunchorst (60), il quale ne aveva negata la natura microbica, erano stati detti *batteroidi.*

---

a) Ricordo che la presenza dei tubercoli è stata segnalata anche in alcune altre piante, come Rhinantus major, Melampyrum pratense, Elaeagnus, Acacia, Alnus glutinosa (Bejerinck (55), Hiltner (56-57), a proposito delle quali però non tutti sono concordi nell'ammettere che possano fissare direttamente l'azoto atmosferico, ritenendosi invece da alcuni (Nobbe e Hiltner (58), che l'arricchimento di azoto nelle culture di queste piante sia da attribuirsi a fatti di nitrificazione da parte dei microrganismi del suolo.

Questi batteroidi, secondo P. rappresenterebbero la forma di completo sviluppo, e forse i corpi riproduttori del microrganismo.

Bejerinck (55) per il primo (1888) riferisce di avere ottenuto in cultura pura il microrganismo produttore dei tubercoli, isolandolo col metodo delle piastre di Koch, ed usando un mezzo nutritivo, di reazione leggermente acida, composto di un decotto di foglie di pisello o di fava con aggiunta del 7 per cento di gelatina, 0.25 per cento di asparagina, e talvolta 1.5-2 per cento di saccarosio. B. descrive tre fasi nello sviluppo di questo, che egli chiama *bacillus radicicola*. In un primo stadio che corrisponderebbe alla vita del bacillo nel terreno si avrebbero piccolissimi bastoncelli di $0.9 \times 0.18\ \mu$, mobili, che penetrerebbero nei peli radicali delle leguminose dando luogo ai cosiddetti *canali d'infezione*, i filamenti interpetrati come ifi dal Prillieux, e che Bejerinck considera come ammassi zoogleici di questi piccolissimi bacilli propagantisi lungo il pelo e da una a un'altra cellula nell'interno della radice. Qui si trasformerebbero in una seconda forma bacillare mobile molto più grande ($4 \times 1\ \mu$), asimmetrica, affusata o gibbosa, che finalmente darebbe luogo alla forma finale, i batteroidi, incapaci di ulteriore sviluppo e funzionanti solo come sostanza albuminoide sintetizzata. B. asserisce di avere osservato sotto il campo del microscopio la trasformazione dei batteroidi in forme batteriche mobilissime, ma tale osservazione non è poi stata ulteriormente confermata. Di più afferma che nelle culture artificiali si osservano regolarmente forme ramificate dei batteroidi identiche a quelle dei tubercoli. Il *B. radicicola* è aerobio, non sporigeno, muore tra 60° e 70°, ha l'*optimum* di temperatura verso 15°, ma sviluppa ancora da 0° a 47°. Se ne distinguerebbero due varietà: una che dà grosse colonie di aspetto jalino, che sviluppano male sulla gelatina di carne e peptone, favorite dal saccarosio e dal glucosio, con bacilli piccolissimi nel primo stadio, batteroidi biforcati o piriformi (veccia, trifoglio, pisello, latiro); l'altra con colonie più bianche, opache, sviluppantisi più facilmente sulla gelatina di carne, con bacilli del primo tipo più lunghi, batteroidi a bastoncello, raramente biforcati (fagiolo, lupino, robinia).

Prazmowski (79) fece culture in mezzi liquidi, che evidentemente non possono aver nessun valore come culture di isolamento. Colla gelatina di Bejerinck, osservò colonie che però crescevano molto lentamente, mantenendosi sempre assai piccole, alquanto rilevate, simili a goccie di stearina solidificata. Il *bacterium radicicola* di Pr. si presenta come un bastoncello mobile assai piccolo, spesso riunito in catenelle. Pr. nega che i batteroidi appartengano al normale ciclo di sviluppo del microrganismo, ma ritiene invece che dipendano dall'influenza del plasma cellulare della pianta vivente: non ha mai potuto osservarne nelle sue culture liquide o solide.

Quasi nello stesso tempo, Frank (13) studiando i tubercoli di pisello e di lupino, descriveva il suo *Rhizobium leguminosarum*, che egli paragona a un micrococco, piccolissimo, che penetrerebbe nella radice con o senza l'intermodiario dei canali d'infezione, i quali spesso mancano. Il suo movimento è molto variabile e talvolta può mancare: non avrebbe luogo la trasformazione in batteroidi, ma questi non sarebbero che un prodotto del protoplasma cellulare irritato per la presenza dei batteri. In piastre di gelatina si avrebbe, molto lentamente, lo sviluppo di colonie circolari od ellittiche, rilevate, gialliccie, talora fondenti, talora no.

Anche più discordanti da quelli dei precedenti AA. sono i risultati delle ricerche di Gonnermann (87), il quale, con una tecnica invero molto imperfetta, isolò dai tubercoli del lupino non meno di 10 differenti specie batteriche, tutte energicamente fluidificanti la gelatina, alcune delle quali avrebbero dato risultato positivo in alcuni esperimenti di inoculazione condotti pure assai poco rigorosamente. G. mentre ritiene i batteroidi come speciali aggruppamenti di batteri, non verificabili al di fuori delle leguminose, non ammette le trasformazioni descritte da Bejerinck nel *b. radicicola*.

Kirschner (39) descrisse i microrganismi tubercolari del *Soja hispida* come bastoncini, spesso incurvati di $2.2 \times 0.8\ \mu$ con contenuto granuloso, immobili, non fondenti la gelatina.

Mazè (88) attribuisce un alto grado di pleomorfismo al microbio da lui isolato dai noduli e ad altri isolati dal terreno e che egli crede potere identificare col bacillo delle leguminose, attribuendogli nell'interno dei tessuti una forma di coccobacillo mobile che poi si trasformerebbe in una forma ramificata, mentre nel suolo si presenterebbe in due forme, un batterio immobile a spore endogene ed un'oospora (?).

Smith (89) vede nel microrganismo delle leguminose una cellula blastomicetica che per processo di gemmazione potrebbe dar luogo a separazione di bastoncelli mobili (?), mentre quando la capsula è molto resistente questi bastoncelli essendo obbligati a rimanere uniti alla cellula madre darebbero luogo alle forme ad Y!

Chiarizia (90) descrive numerosi *bacilli radicicoli*, ma senza dire da quali piante e con quali modalità sieno stati isolati, e senza portare nessuna prova del loro potere di formare tubercoli nelle coltivazioni di leguminose.

Mette conto finalmente di ricordare le recenti memorie del Moore (91-92), il quale circa la morfologia del b. radicicola che egli propone di chiamare *Pseudomonas radicicola*, non fa in ultima analisi che ripetere le affermazioni di Bejerinck ma con alcune varianti, le quali non sono fatte certo per renderle più attendibili. Egli distingue infatti le solite tre forme:

1° una forma bacillare piccolissima esistente nel suolo (*questa è una supposizione che non ha mai potuto essere dimostrata da un dato di fatto!*), di $1 \times 0.2\ \mu$, mobile (ma nella quale non si è mai potuto dimostrare il ciglio polare attribuitole da Bejerinck), che penetra nei peli radicali e che può dare o non dare luogo a speciali masse zoogleiche filamentose;

2° questi piccoli bacilli si trasformano in un grosso bacillo di dimensioni variabilissime (0.6 a $2.5\ \mu$ di spessore $\times$ 1.5 a $5\ \mu$ di lunghezza!) mobile o immobile (*è chiaro che tale latitudine di caratteri non permette nessuna sicura identificazione!*);

3° si avrebbe poi la trasformazione nella forma ramificata che sarebbe un aggregato di 2 o più bastoncelli tenuti assieme da una capsula gelatinosa.

Nota però il Moore che molto spesso le prime due forme mancano, ed anche nei giovanissimi tubercoli si trovano solo forme ramificate! La coltivazione di ognuna delle tre forme ricordate su gelatina darebbe luogo a produzione di colonie chiare, trasparenti, non liquefacenti: *quasi ogni terreno di cultura è sufficiente*, ma una gelatina composta con estratto della pianta ospite più 1-3 per cento di peptone e 2 per cento di saccarosio, dà il

più rapido e lussureggiante sviluppo. Invece un mezzo nutritivo molto scarso di sostanze azotate, composto con 1 di agar, 1 di maltosio, 0.1 di fosfato monobasico di potassio, 0.02 di solfato di magnesia, per 100 di acqua, dà luogo a sviluppo assai più scarso.

3. — Studi circa la specificità delle culture della Pseudomonas radicicola Bejerinck: trasformazione in batteroidi; fissazione dell'azoto.

Ad onta delle evidenti lacune ed imperfezioni nella conoscenza naturalistica della *Pseud. radicicola Bej.*, la maggior parte degli AA. hanno ritenuto e ritengono tuttora questo microrganismo come l'agente specifico della produzione dei tubercoli. Ed a conferma di tale opinione si è cercato di portare una serie di prove che possono dividersi in 3 categorie: 1° tentativi di trasformazione delle forme bacillari osservate comunemente nelle culture, in forme ramificate o batteroidi; 2° ricerca di un' eventuale fissazione d' azoto da parte delle culture pure su mezzi nutritivi artificiali; 3° esperimenti di infezione di semi piantati in terreni sterilizzati, colle culture pure.

L'affermazione di Bejerinck, che potessero osservarsi forme di batteroidi nelle comuni culture pure non è stata confermata dai successivi autori.

Mazé (88) coltivando i batteri da lui isolati, a temperatura elevata, su agar con aggiunta di 1 °/₀₀ di acido tartarico o citrico, dice di avere spesso osservato forme ramificate, ma l'esame dei suoi fotogrammi fa sospettare che in molti casi si tratti di semplice giustaposizione di forme bacillari o di forme involutive o degenerative dovute alle cattive condizioni di sviluppo, e che in ogni modo non sembrano aver nulla a che fare coll'aspetto dei batteroidi quali si osservano nei tubercoli. Queste osservazioni possono farsi anche a riguardo delle esperienze di Stutzer (93) e di Hiltner (94) che coltivando i batteri in liquidi a base di glucosio, asparagina e fosfato acido di potassio con o senza aggiunta di acidi organici, oppure in estratto di foglie e radici di pisello con aggiunta di asparagina e glucosio, dicono di aver osservato grosse forme ramificate ricordanti lontanamente i batteroidi. Inoltre lo Stutzer (95) con ulteriori ricerche viene a contraddire la precedente affermazione di aver trasformato le forme bacillari della cultura pura del radicicola in forme ramificate, quando asserisce che soltanto le forme di batteroide, non esistenti nei tubercoli molto giovani, sono capaci di dar luogo alla produzione di forme ramificate nei mezzi artificiali di cultura!

Del resto, Neumann (96) impiegando i liquidi nutritivi indicati da Hiltner e Stutzer ottenne sempre risultati negativi. Vero è che egli dice aver osservato qualche forma ramificata in terreni liquidi a base di estratto di radici, infuso di terra, orina, ecc.! Invece Suchting (97) afferma che basta coltivare il radicicola su un terreno solido ricoperto di uno strato di acqua distillata sterile, per avere la comparsa di forme ramificate. Egli non riporta nessun fotogramma, ma Moore (91) che ha confermato la sua asserzione, riporta in prova una nitidissima fotografia nella quale si notano, fra le molte bacillari, una o due forme forse grossolanamente ramificate ma nelle quali colla mag-

giore buona volontà non si riesce a trovar nulla che ricordi i veri batteroidi.

Quanto al secondo punto più sopra accennato, la ricerca cioè di un'eventuale fissazione di azoto libero da parte delle culture pure dei bacilli isolati dai tubercoli, i primi tentativi di Bejerinck (80) dettero risultati di cui lo stesso autore riconosce la estrema incertezza. Dicasi lo stesso di alcune ricerche del Frank (18), mentre invece il Bertholot (98) non usando culture, ma portando direttamente in una soluzione nutritiva i noduli pestati vide che in questa condizione viene fissata in 4 mesi una notevole quantità di azoto. Anche Heinrich (99) non potè osservare fissazione di azoto libero da parte di culture pure dei bacilli isolati dai tubercoli delle leguminose. Stutzer Burri e Maul (100) dai loro esperimenti su questo argomento, fatti innestando il b. radicicola in grossi palloni contenenti una soluzione acquosa di glucosio con adatti sali minerali, traggono la conclusione che le differenze tra i palloni infetti e i testimoni sono così straordinariamente piccole che non si può parlare di una fissazione di azoto da parte dei batteri. Le prime ricerche positive sarebbero dunque quelle di Mazé (101) che in esperimenti di cultura in estratto di fagiolo, o in agar con estratto di fagiolo e saccarosio (2 %), distribuiti in varie boccie di Erlenmeyer disposte in serie, innestate con b. radicicola e attraversate da una corrente d'aria che egli ritiene di essere riuscito a sbarazzare, coi consueti mezzi chimici, di ogni traccia di azoto combinato, avrebbe dopo 15 giorni osservato lieve aumento della quantità di azoto. Ma Smith (89), facendo numerosi esperimenti anche coi mezzi nutritivi e col dispositivo indicati dal Mazé, non potè mai constatare che le culture del b. radicicola pure, o in simbiosi con altri microrganismi isolati dai tubercoli, dessero luogo alla più piccola fissazione di azoto atmosferico. Queste ricerche di Smith tenevano conto anche dell'ipotesi emessa da Stutzer (102), e basata su analoghe osservazioni fatte da Winogradski (103) su speciali bacilli fissatori di azoto esistenti nel terreno, che cioè nelle culture la fissazione dell'azoto potesse aversi solo per simbiosi con altri microrganismi portati dalla pianta ospite. Finalmente, risultati affatto negativi, circa la fissazione dell'azoto da parte della culture, ebbero le ricerche di Immendorf (104) e di Gonnermann (87).

4. — Ricerche sulla riproduzione sperimentale dei tubercoli: Unità o pluralità di specie dei radicicoli — Le Nitragine.

Resta ora a dire del terzo ordine di ricerche istituite colle culture pure del b. radicicola, dei tentativi cioè d'infezione sperimentale, i quali si confondono colla questione tanto importante dal punto di vista pratico, della inoculazione con culture pure, del terreno coltivato a leguminose allo scopo di aumentarne la fertilità. Ma per orizzontarci bene, conviene prima accennare ad un'altra questione molto dibattuta fino dai primi tempi in cui si cominciò a studiare l'argomento: quella cioè della unicità o pluralità delle specie che dànno luogo ai tubercoli delle varie leguminose. Si noti che in generale tale questione non si è basata sullo studio di eventuali differenze morfolo-

giche o biologiche dei batteri o delle loro culture, ma sui risutati della esperienza agricola o degli esperimenti di infezione. Già Hellriegel e Willfahrt (10) nelle loro prime comunicazioni, osservavano che l'innesto di una medesima sorta di terreno, influenzava molto diversamente le diverse leguminose, e che per es. i tubercoli radicali del pisello si mostravano affatto inattivi per la serradella e i lupini. Bejerinck (55) pur distinguendo, come abbiamo visto, due grandi gruppi, propendeva dapprima per l'unità della specie, ma più tardi (105), riconosceva invece ragguardevoli differenze nei bacilli delle singole specie di leguminose. Difese poi il principio dell'unicità il Frank (13), lo combatterono Salfeld (106), Gonnermann (87), Kirschner (39), Mazé (101).

Una lunga serie di lavori sull'argomento fu eseguita nella stazione sperimentale di Tharand, da Nobbe, Schmidt, Hiltner, Hotter (107 a 114). Distinguendo in 6 gruppi le più importanti papilionacee (*phaseolaceae*, *vicîaceae*, *trifolieae*, *galegaceae*, *genisteae*, *hedysaceae*), furono eseguiti numerosi esperimenti di coltivazione di tali piante su terreni privi di azoto, sterilizzati, e praticandone l'infezione con culture isolate da piante appartenenti a ciascuno dei gruppi ricordati, o con sospensioni di terreno in cui tali piante erano vissute. Se ne deduce, nota giustamente Stutzer (115) che la infezione ha luogo con sicurezza solo se le piante vengono infettate con microrganismi appartenenti alla stessa specie. Un' eccezione si avrebbe solo per le viciacee potendo fino a un certo punto sostituirsi fra loro i microrganismi della veccia e del pisello, ma in altri gruppi, se anche con microrganismi appartenenti ad altra specie può aversi formazione di tubercoli, questi restano affatto inefficaci. Ciò non di meno, secondo i ricordati AA., i batteri delle leguminose dovrebbero considerarsi non come specie diverse, indipendenti l'una dall'altra, ma come forme di adattamento, razze culturali di una medesima famiglia. A conferma di che, Nobbe e Hiltner (116), mediante un semplice passaggio su pianta di fagiolo, sarebbero riusciti ad adattare completamente a questa pianta i batteri isolati del pisello, ed a tal punto da renderli inadatti alla pianta ospite originaria! Bühlert (117) ripetendo l'esperimento con questi batteri « incrociati » (isolati da tubercoli di piante di fava infettate con batteri del pisello), li trovò ugualmente efficaci per le due leguminose. Stutzer, Burri e Maul (100), avrebbero dimostrato un analogo potere di adattamento del b. radicicola coltivato su mezzi artificiali. Essi asseriscono che un bacillo isolato dai tubercoli dell'erba medica, che nasceva rigoglioso su gelatina glucosata preparata con estratto di questa pianta, mentre dava sviluppo dapprima stentato e poi negativo su gelatina con estratto di senape, fu completamente reso adatto a vivere su questo mezzo nutritivo, mediante una serie di passaggi su miscugli dei due terreni, con quantità dapprima scarsa e poi sempre maggiore, di quella a base di senape. Sembra trattarsi di un unico esperimento i cui risultati possono interpretarsi in vario modo! Altri studi di Hiltner (118) e di Buhlert (119), confermano i fatti riferiti circa la non sostituibilità dei bacilli di varie specie, ma questi AA., come pure Jacobitz (120), insistono sul concetto dell'unicità. Invece Schneider (121 a 124), Bolley (125) e con recenti ricerche anche Hiltner e Störmer (126), sostengono la esistenza di due o più varietà ben distinte per caratteri biologici, e fino a un certo punto anche morfologici.

Ritornando ora alla quistione della inoculazione del terreno col b. radici-

cola, conviene anzitutto ricordare che molti AA. si occuparono della questione della fertilizzazione del suolo mediante il trasporto di terra contenente i microrganismi specifici, nonchè dei rapporti esistenti fra le condizioni fisico-chimiche del suolo, lo sviluppo dei microrganismi e la vegetazione delle leguminose (Schmitter (127), Vrieze (128), Salfeld (129-130), Lingen (131), Take e Immendorf (132), Meyer (133), Richter (134), Thiele (135), Grandeau (136), Schultze (137), Wohltmann (138). Ma Nobbe e Hiltner furono i primi che, traendo una pratica applicazione dai loro studi, vollero tentare la inoculazione di culture pure del b. radicicola, mettendo in commercio (139), varie *nitragine*, una serie cioè di culture pure su gelatina, distinte per ciascuna delle specie di leguminose. Si ebbe così un' esperienza pratica, fatta in grandi proporzioni, circa la efficacia delle culture pure del b. radicicola nella produzione dei tubercoli, la quale esperienza costituisce il terzo dei punti da me ricordati come base di una dimostrazione scientifica della specificità di questo microrganismo.

Ma non sembra che nemmeno questo terzo ordine di prove abbia dato risultati dimostrativi. Senza soffermarmi a riferire minutamente circa le numerosissime memorie pubblicate a riguardo degli esperimenti eseguiti colla nitragina, mi limito a citare quelle di Luberg (140), Frank (141), Wollny (142), Dawson (143-44), Edler (145), Stoklasa e Sempolowski (146), Lutolawski (147), Burchardt (148), Kühn (149), Halstead (150), Hensolt (151), Remy (152), Fruhwirth (153), Rossati (154), Thiele (155), dall'insieme delle quali risulta che ad onta dei primi risultati apparentemente favorevoli, in realtà l'impiego di questi preparati per facilitare o rendere più rigogliosa la vegetazione delle leguminose sui terreni vergini, scarsi o mancanti dei microbi specifici, dà risultato del tutto negativo. Tanto è vero che gli stessi Nobbe e Hiltner, ritornando ripetutamente sull'argomento con numerose memorie (118, 126, e 156 a 163), cercarono di determinare le cause dell' insuccesso del loro preparato, concludendo coll'ammettere una *perdita di virulenza* dei microrganismi coltivati; e procurarono di modificare le loro nitragine cercando di esaltare la virulenza stessa del b. radicicola, facendolo sviluppare in più opportuni mezzi di cultura. Ma sebbene l' Hiltner (164) affermi di avere ottenuto con tale nuova nitragina risultati favorevoli in un certo numero di casi, la sua asserzione non è stata generalmente confermata.

Anche il Moore (91) accetta la spiegazione fornita dall'Hiltner circa la inefficacia delle nitragine, affermando che i microrganismi coltivati sui mezzi di cultura contenenti sostanze azotate « sono di virulenza assai ri« dotta, e portati nel suolo perdono la possibilità di mutarsi nelle minute « forme necessarie per la penetrazione nei peli radicali. Essi contempora« neamente perdono il potere di fissare l'azoto atmosferico, che è una pro« prietà dei batteri nodulo-formatori in certe condizioni ». Invece, secondo il M. le coltivazioni su mezzi solidi privi o poverissimi di azoto, come quello già ricordato (§ 2) a base di agar, maltosio e sali minerali, mentre darebbe luogo a uno sviluppo molto più scarso, manterrebbe se pur non aumenterebbe il potere del microrganismo di produrre i noduli e fissare l'azoto. Partendo da queste considerazioni, il Moore ha preparato uno speciale materiale batterico da inoculazione, che egli distribuisce seccato su batufoli di cotone idrofilo. I risultati che, secondo egli riferisce, se ne sono ottenuti negli esperimenti pratici di cultura delle leguminose, in varie località degli

Stati Uniti, sarebbero in gran parte favorevoli: altrove invece, ed anche in Italia (come recentemente riferiva il Grüner (165), accanto a qualche risultato incoraggiante non sono mancati quelli molto dubbi o del tutto negativi.

5. — Opportunità di ulteriore studio dell'argomento.

Brevemente riassumendo ciò che finora si è esposto, si può concludere che, dopo tanta mole di studi e di ricerche (*a*), non siamo poi gran che più avanzati nella conoscenza scientifica del processo di fissazione dell'azoto da parte delle leguminose, di quel che non lo si fosse 20 anni or sono, dopo la pubblicazione delle memorie, da ritenersi fondamentali, di Hellriegel e Willfahrt (10), e di Bejerinck (55). I fatti che anche oggi possono ritenersi indubbiamente accertati e cioè: 1° *fissazione dell'azoto libero da parte del suolo piantato a leguminose*; 2° *rapporto indissolubile tra questa fissazione di azoto e presenza dei tubercoli radicali*; 3° *causa parassitaria della formazione dei tubercoli*; 4° *possibilità di ottenere culture batteriche mediante innesto del materiale interno dei tubercoli su vari terreni nutritivi*; si rilevano già positivamente dalle memorie dei ricordati AA. Ma d'altra parte, la conoscenza del microrganismo formatore dei tubercoli è tutt'altro che positivamente e scientificamente stabilita. Ciò appare indiscutibile non solo se si ponga mente alla molteplicità dei microrganismi che i vari AA. avrebbero isolato dai noduli, ma anche se si tenga conto della sola *Pseudomonas radicicola* che oggi si ritiene generalmente come il vero microrganismo produttore dei tubercoli. Ebbene, quanta incertezza ancora, quanti dubbi, quale scarsa conoscenza si ha delle sue reali proprietà, e quali deboli basi presenta finora, in conseguenza, la opinione della sua specificità!

Intanto, dal lato morfologico, pur menando buona la ipotesi, (e uso tale parola, dappoichè leggendo attentamente le memorie dei vari AA. si deduce altro non essere questa che una pura e semplice ipotesi senza una base positiva di osservazione), della triplice trasformazione del bacillo radicicola, noi sentiamo parlare di una prima forma, di cui si sa soltanto che essa è *mobile*, *piccolissima e può molto spesso mancare!* —; sentiamo parlare di una trasformazione di tale forma in una seconda, nei cui caratteri, *mobilità o immobilità e dimen-*

(*a*) Io non ho avuto la pretesa di raccogliere la bibliografia completa dell'argomento, eppure, solo per documentazione di questo breve riassunto storico, ho dovuto tener conto di circa 170 memorie!

sioni oscillanti tra 0.6 a 2.5 μ di spessore, e 1.5 a 5 μ di lunghezza (!), *rientrano a dir vero tutti o quasi tutti i bacilli conosciuti!* —; e finalmente sentiamo parlare di una terza forma, i batteroidi, di cui, sulla base di una affermazione di poi non confermata del Bejerinck vuol farsi una specie di *piccola colonia da cui son pronti a staccarsi i misteriosi piccolissimi bacilli destinati a tornare nel suolo.* Di fronte a tanta complicazione di particolari morfologici, abbiamo, in apparenza, una grande semplicità di reperto culturale: tutte queste forme darebbero luogo a culture i cui caratteri (limitandoci ben inteso alla *Pseud. radic. Bej.*, poichè i microrganismi isolati dagli altri AA. hanno caratteri del tutto diversi) si riducono a questi: *bacilli mobili non fluidificanti la gelatina.*

Or si ponga mente ai tre fatti precedentemente stabiliti della impossibilità della reale trasformazione dei bacilli di tali culture in batteroidi, della dimostrata incapacità delle culture stesse a fissare l'azoto, e della incertezza tuttora regnante circa la efficacia loro come materiale di inoculazione delle culture di leguminose: se tali fatti i quali da soli non avevano forse una importanza decisiva, potendosi invocare per i primi due la necessità dell'azione simbiotica delle leguminose, per il terzo la questione della cosiddetta « virulenza », si mettono a confronto colla rilevata straordinaria indeterminatezza dei microrganismi descritti come *Pseudomonas radicicola*, non apparrà forse pienamente giustificata la nostra affermazione che la conoscenza del microrganismo produttore dei tubercoli delle leguminose è finora tutt'altro che completa, e fondata su basi scientificamente indiscutibili? Io non voglio con ciò asserire in modo assoluto che il Bejerinck o qualche altro ricercatore non abbiano forse coltivato il vero microrganismo specifico dei tubercoli delle leguminose: anzi i risultati in parte positivi di inoculazione ottenuti dal Nobbe, dal Moore e da altri, fanno ritenere probabile che questi abbiano avuto talvolta a che fare con culture *pure o impure* di tale germe, ma non vi ha dubbio che *i caratteri che di esso ci sono riferiti dai vari AA. sono forse in parte erronei, certo manchevoli e insufficienti per una diagnosi sicura secondo le buone norme della tecnica batteriologica*, e che quindi nella massima parte dei casi si è caduti, e, nello stato attuale delle nostre conoscenze, si continua a cadere in errori grossolani.

Di ciò, anche prima dello studio della letteratura, io mi sono convinto nel corso dei tentativi d'isolamento del b. radicicola, di cui volevo studiare alcune speciali particolarità biologiche. Ma tale isolamento che viene descritto generalmente come un processo della

massima facilità e semplicità mi si presentò invece fin dai primi passi complicato da siffatte cause di errore e di incertezza, da decidermi a mutare l'oggetto delle mie ricerche, indirizzandole intanto a risolvere tali inaspettate difficoltà. Ora, nel corso di tale studio io ebbi modo di rilevare — e li riferisco nella presente memoria — alcuni fatti assai interessanti circa un microrganismo che — in determinate condizioni — si può costantemente isolare dai tubercoli. La sua identificabilità colla *Ps. radicicola*, è per lo meno assai dubbia, sebbene la latitudine dei caratteri attribuiti a quel microrganismo sia tale, da rendere impossibile, come già accennai, una diagnosi differenziale con buona parte dei batteri conosciuti! Ma ciò che specialmente mi preme rilevare si è che le particolarità morfologiche e culturali da me poste in luce, pur dovendo essere completate da ulteriori ricerche, sono già sufficienti, in base a fatti positivamente osservati, a caratterizzare il microrganismo da me studiato e a dimostrarne inconfutabilmente la specificità come agente produttore dei tubercoli.

6. — Esposizione della tecnica sperimentale seguita nel presente lavoro.

Le mie ricerche, indirizzate dapprima all'isolamento del b. radicicola furono iniziate su diverse leguminose (fava, pisello, trifoglio, veccia, lupino...), ma di poi, vista la necessità di insistere in un dato ordine di esperimenti per confermare alcune osservazioni specialmente interessanti, le limitai ad una sola specie prescegliendo la fava: è quindi solo a questa pianta che si riferiscono per ora i fatti che sto per descrivere, riserbandomi di tornare sull'argomento per dire degli esperimenti già iniziati o da iniziarsi sulle altre leguminose, e che tutto fa credere daranno risultati analoghi a quelli osservati nelle fave. Gli esperimenti furono proseguiti dai primi di dicembre dell'anno passato fino agli ultimi del maggio scorso, esaminando non meno di 60 piante di fava, nei più diversi stadi di sviluppo, e cioè dai primi giorni dopo il germoglio, fino allo stadio di maturazione avanzata: trattavasi di piante coltivate nei punti più diversi della pianura pisana, come anche di piante seminate nel giardino dell'Istituto, o in appositi recipienti. Di ognuna furono sempre utilizzati numerosi tubercoli: si ha quindi un grandissimo materiale di osservazioni che sarebbe molto ingombrante e in parte superfluo riferire. Perciò credo più opportuno, dopo avere esposto la tecnica seguita nell'esecuzione dei vari esperimenti, dar conto in

modo assai minuto, ma sintetico, dei fatti osservati più e più volte in modo perfettamente identico.

Da ciascuna pianta di fava (escluse naturalmente quelle troppo giovani che non avevano ancora tubercoli manifesti), si staccavano delicatamente, da punti diversi delle radice, 12-15 tubercoli di varia dimensione che si sciacquavano a lungo, agitandoli vigorosamente, con acqua di fonte. Venivano quindi esposti, in un piccolo recipiente con tappo a due fori, a una violenta corrente derivante da una condotta d'acqua a pressione che li manteneva in continua agitazione facilitando il distacco delle più minute particelle di terra. Di quà erano trasportate in una provetta con acqua distillata sterilizzata che si cambiava una ventina di volte nel corso di un'ora sbattendo violentemente ogni volta il contenuto della provetta, chiusa con tappo smerigliato. Finalmente i tubercoli con una pinza sterilizzata si portavano in una capsula di Petri contenente qualche disco di carta bibula, il tutto previamente sterilizzato nella stufa ad aria secca. A scanso di inutili ripetizioni, noto che tutti i liquidi, gli utensili, i recipienti ecc., di cui mi servivo per l'ulteriore trattamento dei tubercoli, erano sicuramente sterilizzati mercè il calore.

Allontanata per mezzo della carta bibula ogni traccia dell'acqua che bagnava i tubercoli, questi, trasportati in una seconda capsula di Petri, venivano sezionati con un bisturì, e quindi afferrandone successivamente le due metà con una pinza, con un ago di acciaio acuminato se ne asportava una piccola particella del materiale centrale, avendo cura di non toccare gli strati esterni colla punta dell'ago.

Il materiale di un solo tubercolo, se questo era di dimensioni piuttosto notevoli, di 2 o 3 se si trattava di tubercoli piccolissimi, veniva portato in una provetta. Per ciascuna pianta si preparavano almeno 3 o 4 di queste provette, in cui il materiale raccolto veniva poi finamente spappolato con poche goccie di acqua, portate poi a 2-3 o più cmc., secondo i casi, in modo da avere un liquido uniformemente e intensamente torbiccio di cui si allestivano preparati microscopici a fresco in goccia pendente e da colorarsi, e che poi si distribuiva sui substrati nutritivi già preparati.

I mezzi di cultura adoperati furono:

a) gelatina semplice al 10 %, con estratto di carne (1 %), peptone (1 %) e Na Cl (0.5 %), di reazione leggermente alcalina o leggermente acida (acidità naturale);

b) gelatina all'estratto di fava preparata facendo bollire 1 parte di foglie di fava in 8-10 parti di acqua di fonte, filtrando e aggiungendo il 10 % di gelatina, talvolta l'1-2 % di saccarosio o di glucosio, l'1 % di peptone e il 0.5 % di Na Cl e sottoponendo il tutto al procedimento consueto per la preparazione della gelatina semplice. Reazione leggermente alcalina o leggermente acida;

c) agar semplice, oppure all'estratto di fava, preparato nel modo consueto, e con gli stessi ingredienti usati per la gelatina, sostituendo a questa l'1.5 % di agar.

Per le culture, invece del consueto metodo di isolamento, mediante disseminazione del materiale nel mezzo nutritivo liquefatto, da versarsi poi nelle capsule di Petri, ho preferito il metodo (utilizzato da Drigalski per l'isola-

mento del b. del tifo), della distensione del liquido contenente il materiale da inocularsi sulla superficie del mezzo di cultura già solidificato nelle capsule, per mezzo di un'apposita spatola di vetro sterilizzata. Sono molto notevoli in questo, come in varii altri casi, i vantaggi di tale metodo di isolamento, il quale dando luogo a sviluppo di sole colonie superficiali che crescono più rapidamente ed hanno in generale struttura più tipica, rende più rapida e facile la diagnosi e soprattutto molto più agevole la pesca e l'isolamento delle colonie. Con una pipetta sterile, distribuivo qualche goccia del materiale finamente emulsionato sulle piastre contenenti il mezzo nutritivo solidificato e quindi con rapidi movimenti della spatola di Drigalski (utilmente modificata dal dott. Neri, assistente in questo Istituto d'Igiene, rendendola assai più facilmente maneggevole e dando al ramo orizzontale una forma curva più adattata alla sagoma delle capsule) spargevo uniformemente il liquido su tutta la superficie.

In molte ricerche si usarono tutti i mezzi di cultura ricordati, in altre solo alcuni, ma non si tralasciò mai l'impiego della gelatina di fava leggermente acida. Le piastre così preparate venivano poste al termostato, a temperatura che, nel lungo periodo delle esperienze oscillò tra 15° e 20°; quelle di agar vennero esposte qualche volta al termostato a 37°, ma con risultato quasi sempre negativo.

7. — **Osservazioni microscopiche sul contenuto dei tubercoli.**

Prima di dar conto dei fatti rilevati negli esperimenti di coltivazione, voglio dire brevemente circa le osservazioni microscopiche fatte, con preparati a fresco e colorati, sul contenuto dei tubercoli, utilizzando sia il materiale di ciascuna delle emulsioni adoperate per l'innesto, sia molti altri tubercoli appositamente esaminati.

Nei primissimi stadi di sviluppo il tubercolo è, per così dire, preannunziato da un rilievo quasi impercettibile sulla piccola radice: senonchè asportandone con un bisturì affilato la epidermide, si nota un piccolissimo punticino di colorito un po' più scuro che non sia il resto del tessuto della radice, e che è l'inizio del tubercolo. Asportato colla punta di un ago questo materiale, si vede esser composto di bastoncelli, immobili in goccia pendente o dotati solo di movimento browniano assai attivo, ma che non può in alcun modo dar luogo ad equivoci col movimento proprio, che ha tutto altro carattere. Sono di lunghezza un po' variabile, ma di spessore uniforme di circa 0.5 μ., ben colorabili coi comuni colori di anilina, ma non resistono al metodo di Gram. La fig. 1 (Tav. XI) riproduce un preparato di questi bacilli colorati col violetto di genziana. Bacilli mobili nè grandi nè piccoli non si sono mai osservati. In uno stadio poco più avanzato si nota tutta una serie di passaggi, per cui alcuni bacilli appaiono dapprima come ingrossati a un'estremità, quindi

comincia ad apparire una piccola biforcazione terminale e finalmente si ha — e molto spesso già nei piccolissimi tubercoli — la tipica forma ramificata ad Y (vedi fig. 2) che — almeno nei tubercoli della fava — si presenta con una notevole costanza di forma e di dimensioni, che contrasta colla variabilità asserita da molti AA. In questo stadio, tutta la parte centrale del tubercolo è composta da un numero enorme di queste forme ramificate; a mala pena e con molta fatica si riesce in qualche caso ad osservare qua e là una forma bacillare. Si noti che tali forme, che seguiteremo a chiamare *batteroidi*, pur essendosi modificate, mantengono all'incirca lo stesso spessore delle forme bacillari precedentemente osservate, ed evidentemente non rappresentano nè una degenerazione nè una vera e propria trasformazione, ma semplicemente uno stadio ulteriore di sviluppo delle prime. Esse, in goccia pendente, appaiono dotate di movimento browniano, sono colorabili coi comuni colori di anilina, non col metodo di Gram.

Ma ben presto le forme ramificate subiscono una ulteriore modificazione. Pur mantenendo dapprima intatta la forma, le dimensioni e gli altri caratteri, cominciano ad apparire in esse delle formazioni circolari, che non si colorano coi metodi di colorazione delle spore, che nemmeno assumono i comuni colori di anilina, e che probabilmente devono interpretarsi come vacuoli. Queste formazioni sono dapprima assai piccole, relativamente scarse, limitate ad alcuni batteroidi e localizzate nel ramo maggiore o nei due rametti terminali i quali sembrano come sormontati da due sferette (v. fig. 3). La presenza di questi *batteroidi vacuolizzati* (si noti che adottando per ora questo nome, io non intendo pronunziarmi in modo assoluto circa la natura delle formazioni ricordate) non è, come lo hanno interpretato molti altri che pure lo hanno osservato, un fatto accidentale, un indizio del preteso polimorfismo dei batteroidi, ma è costante, in un determinato periodo dello sviluppo del tubercolo, ed è sempre preceduto dallo stadio che diremo dei *batteroidi integri*. La vacuolizzazione va facendosi sempre più intensa, e a un certo punto tutto il materiale dei tubercoli è formato da questi corpiciattoli che pur mantenendo di poco modificata la loro forma, in goccia pendente appaiono composti come di tante piccole sferette giustaposte, e nei preparati colorati si mostrano tutti quanti fortemente vacuolizzati (v. fig. 4). In progresso di tempo la forma dei batteroidi così vacuolizzati accenna ad alterarsi, essi si rigonfiano alquanto, ma *non ha mai luogo una ulteriore reale trasformazione*, nemmeno nei tubercoli di piante a completa maturazione.

Concludendo dunque, nei tubercoli della fava (ed ho anche qualche osservazione analoga per le altre leguminose) *non ho mai veduto forme mobili, nè grandi nè piccole: non ho potuto osservare nè i piccoli bacilli infettanti nè la trasformazione in essi dei batteroidi.* Ho invece acquistato la convinzione della presenza in essi di una forma bacillare di spessore pressochè costante, e che, secondo un fatto normale in tutti i tubercoli, dà luogo, nel progresso del suo sviluppo, a una biforcazione terminale, che può talvolta suddividersi a sua volta, e finalmente subisce un apparente processo di vacuolizzazione. Niente altro rivela la osservazione accurata: come avvenga il ritorno del microrganismo nel terreno non posso per ora dire in modo sicuro, ma è molto probabile che abbia luogo nella forma di batteroide, senza ulteriori modificazioni, e forse per il semplice fatto del distacco e della macerazione dei tubercoli che hanno raggiunto un certo grado di sviluppo.

8. — Di alcuni microrganismi isolati dai tubercoli radicali della fava, ma che non possono considerarsi come la causa di tali produzioni.

Dirò ora dei risultati dei primi esperimenti culturali eseguiti colla tecnica esposta nel § 6. I saggi furono eseguiti nel dicembre 1905 e nel gennaio 1906, con giovani piante, i cui tubercoli, assai bene sviluppati, avevano un contenuto apparentemente composto di soli batteroidi normali; solo eccezionalmente si osservava nei preparati qualche rarissima forma bacillare.

Le piastre fatte sia con gelatina semplice, sia con gelatina di fava, sia con agar, davano in genere sviluppo dopo 2-3 giorni di dimora a 16°, ad un numero vario, ma sempre assai limitato di colonie, presentantisi come puntolini bianchicci. Proseguendo lo sviluppo si osservava talvolta un miscuglio di colonie molto differenti, tal altra volta invece lo sviluppo di colonie appartenenti a 1 o 2 sole specie. In tal modo, trascurando le piastre in cui si aveva una grande varietà di colonie, e nelle quali era evidente trattarsi di un puro inquinamento da germi del terreno, e tenendo conto solo dei casi in cui si aveva almeno un notevole predominio di una forma di colonia, in questa prima serie di ricerche isolai in cultura pura le seguenti specie:

1. Un piccolo bacillo mobilissimo, sottile, monotrico, che su gelatina di fava dava colonie non fondenti, piccole, rilevate, tondeggianti, bianchiccie, ialine; non sporigeno, non colorabile col Gram:

che sviluppa rapidamente una patina bianchiccia sui trapianti in gelatina di fava (isolato tre volte).

2. Un piccolo bacillo tozzo, immobile, per tutti gli altri caratteri uguale al precedente, ma che nelle colorazioni appariva capsulato (isolato una volta).

3. Un piccolo bacillo, corto, sottile, spesso riunito a coppie, mobile, monotrico, che su gelatina di fava dà colonie piccole, ialine, leggermente gialliccie, e molto lentamente fondenti (isolato due volte).

4. Un piccolo bacillo, sottilissimo, immobile, e per tutti gli altri caratteri identico al n. 1 (isolato una volta).

Invero il risultato di queste ricerche non poteva essere più scoraggiante.

Le scrupolose precauzioni che ho descritte, e la assoluta o quasi assoluta uniformità delle colonie sviluppatesi in ciascun caso, sembravano dovermi mettere al sicuro da un volgare inquinamento da parte dei germi del terreno che imbrattava le radici: come si poteva dunque spiegare tanta variabilità dei microrganismi sviluppatisi? E data questa variabilità si era autorizzati a identificare uno di essi col b. radicicola, in base ai caratteri così superficiali che finora contraddistinguono questa specie? Si aggiunga che il numero delle colonie, molto vario come ho detto, era sempre relativamente limitato, 2-300 al più per ogni piastra, spesso si riduceva a poche diecine, talvolta si avevano piastre affatto sterili...; e d'altra parte l'esame del liquido servito per l'infezione, non che la diretta ispezione microscopica della superficie della piastra, permetteva di riconoscere che sul terreno nutritivo erano stati portati i batteroidi in numero straordinariamente grande... Come spiegare dunque, se da essi doveva svilupparsi il b. radicicola, la straordinaria scarsezza delle colonie? I due fatti apparentemente chiari della diversità e della scarsezza dei germi che sulla piastra avevano dato sviluppo, di fronte al numero enorme e alla identità di aspetto dei batteroidi inoculati, non potevano evidentemente spiegarsi che in un modo; ammettendo cioè che i batteroidi fossero incapaci di colonizzare sui mezzi nutritivi adoperati, e che le colonie sviluppate fossero dovute ad altri germi eventualmente capitati nell'interno del tubercolo ed ivi moltiplicatisi in molto scarsa proporzione.

Una tale ipotesi sebbene contraddicesse alla opinione dominante circa la coltivabilità del radicicola, mi si presentava d'altronde come così suggestiva che io non mi sentii davvero di respingerla senz'altro, ma volli saggiarne con opportuni esperimenti l'attendibilità. Ciò era tanto più facile a farsi, inquantochè, dato il gran numero di batte-

roidi disseminati sulla superficie delle piastre, e lo sviluppo spesso scarsissimo o anche mancante di colonie, appariva facile in questi casi, di poter separare i batteroidi dagli altri microrganismi sviluppatisi sulle piastre preparate da un periodo assai lungo di tempo (12-15 giorni), raschiando la superficie del mezzo di coltura nei punti rimasti ancora privi di vegetazione batterica e dai quali perciò si potevano appunto asportare i soli batteroidi. A tale scopo preparai un gran numero di piastre con gelatina di fava e con diversi materiali di innesto ed utilizzai quelle in cui dopo 12-15 giorni di dimora a 16°, non si erano sviluppate che poche o punte colonie, mentre l'esame microscopico faceva vedere un gran numero di batteroidi intatti. Allora bagnando la superficie apparentemente sterile di tali piastre con acqua sterilizzata, e sfregandola coll'ansa di platino riuscii ad asportarne, colle regole della più scrupolosa asepsi, almeno una parte dei batteroidi.

Con tale sospensione acquosa (controllata microscopicamente) feci tentativi di cultura sui mezzi più vari: gelatina di silice, con aggiunta di sali minerali e di estratto di fava, radici di rape, carote, patate cotte o crude; tentai culture anaerobiche, culture in atmosfera di azoto puro, ecc. ecc., ma tutte senza nessun risultato. Risolsi allora di volgermi a un altro ordine di ricerche, di tentare cioè esperimenti di infezione di piante di fava, fatti coi batteroidi sospesi in acqua sterile e sicuramente privi di batteri capaci di svilupparsi sui comuni mezzi nutritivi, e contemporaneamente con sospensioni acquose di culture di 4° o 5° passaggio su gelatina di fava, di ciascuna delle 4 specie batteriche sopra descritte. Insisto sulla particolarità *di aver usato culture di 4° o 5° passaggio e nelle quali perciò era sicuramente evitato il trasporto dei batteroidi*, precauzione questa indispensabile dato il fatto già ricordato dell'enorme numero di questi nelle piastre d'isolamento.

Voglio a questo proposito ricordare, come nei primi tentativi di cultura su piastra, l'esame microscopico delle colonie sviluppate, mostrava sempre un tale predominio delle forme di batteroidi, da farmi dapprima ritenere che le colonie stesse fossero dovute ad una specie di sviluppo simbiotico dei batteroidi con una forma bacillare: solo dopo qualche tempo mi accorsi che i batteroidi non si moltiplicavano affatto e che quelli osservati non erano che quelli disseminati in grande quantità sulla piastra, ed asportati insieme col materiale batterico sviluppatosi in prossimità di essi. Io credo che in questo fatto debba riconoscersi una causa di errore in cui sono indubbiamente caduti molti che fecero esperimenti di inoculazione

con culture di primo passaggio. Si pensi che la maggior parte degli AA. non parla di culture di isolamento su piastra, ma di semplici strisci su tubi di gelatina a becco di flauto, fatti col materiale del tubercolo; or se si pensa al numero enorme dei batteroidi esistenti in esso di fronte allo scarsissimo numero di germi capaci di svilupparsi sulla gelatina, riesce evidente che molti, asportando la pretesa cultura del b. radicicola trascinarono via insieme senza dubbio un numero grande di batteroidi, e quindi gli esperimenti erano solo apparentemente fatti con prodotti di cultura artificiale, ma in realtà ad essa era unita una gran parte del primitivo materiale d'innesto!

Essendo io dunque in possesso di due materiali ben distinti, e cioè sospensione di culture pure di germi sviluppati sulle piastre di gelatina di fava e batteroidi ripresi dalle piastre stesse ed esenti dai medesimi germi, procedei agli esperimenti d'infezione delle piante, nel modo seguente:

Una serie di vasi da fiori, di terracotta porosa del volume di circa 1500 cmc., di cui il foro inferiore fu chiuso con un batufolo di cotone idrofilo, furono riempiti con sabbia di fiume, lavata e seccata, involti in carta e sterilizzati nell'autoclave Chamberland per 1 ora a 134°. Buoni semi di fava, scelti accuratamente, furono disinfettati tenendoli per mezz'ora in alcool a 60° (preferibile al sublimato, usato comunemente, perchè bagnando più facilmente la superficie ha una molto maggiore azione detersiva) poi lavati ripetutamente e a lungo (per circa un'ora) con acqua distillata sterilizzata, e finalmente immersi o nella sospensione di batteroidi, o nella sospensione di una delle specie batteriche descritte. Quindi per mezzo di una bacchetta di vetro e d'una pinza sterili, si sotterrava un seme in ogni vaso, precedentemente bagnato fino a saturazione colla seguente soluzione salina priva di azoto: cloruro di sodio gr. 0.5; solfato di magnesia 0.5; fosfato di potassa 0.5; fosfato di calce 0.5; acqua 1000.

Dopo la seminagione si aggiungeva qualche cmc. della relativa sospensione di batteroidi o di batteri. Si noti che la prima era straordinariamente più diluita che non la seconda. In ogni ricerca naturalmente si avevano anche alcuni vasi di controllo, trattati nel modo identico, e seminati col semplice seme sterilizzato, ed altri seminati coi medesimi semi sterilizzati e poi bagnati con una emulsione di tubercoli di fave. In conclusione, ogni esperimento era condotto con recipienti e semi sterilizzati e trattati nel medesimo modo e divisi poi in quattro categorie:

a) con sospensione di batteroidi ripresi dalle piastre (molto diluita);

b) con sospensione di batteri, in cultura pura di 4°-5° passaggio;

c) con sospensione di batteroidi prelevati direttamente dai tubercoli;

d) senza nessuna aggiunta di batteroidi o di batteri.

Tutti i vasi di un medesimo esperimento erano, data la stagione fredda, tenuti in un medesimo ambiente del laboratorio; venivano tratto tratto annaffiati con quantità presso a poco uguale di acqua sterile. Non mi preoccupai di proteggerli da un possibile inquinamento da parte dell'aria, il che avrebbe enormemente complicato la ricerca, mentre i risultati di essa, come vedremo, dimostrarono la inutilità di tale precauzione. Difatti le piante del gruppo *d*), si mantennero tutte affatto prive di tubercoli, ciò che dimostra che nello ambiente del laboratorio l'aria non conteneva il microrganismo specifico, almeno in proporzioni tali da poter dar luogo alla formazione di tubercoli.

Le piante vennero di solito dissotterrate per esaminare le radici, dopo circa 2 mesi ½ dalla semina: periodo ritenuto più che sufficiente per lo sviluppo dei tubercoli. L'andamento e il risultato delle ricerche è riferito nelle tabelle in fine del presente paragrafo.

I risultati che se ne deducono sono evidentissimi, e possono così riassumersi:

Mentre i batteroidi rimasti inattivi sui mezzi nutritivi per 15 giorni e da essi ripresi, danno sempre luogo alla produzione di tubercoli negli esperimenti di inoculazione, invece i vari microrganismi sviluppatisi negli stessi mezzi di cultura e trapiantati in serie per 4-5 volte, e fra i quali ve ne erano due i cui caratteri morfologici e biologici non differivano in nulla da quelli attribuiti al b. radicicola Bejerinck, si sono sempre mostrati affatto inattivi. L'importanza di questa constatazione mi sembra assai notevole come quella che fornisce un argomento molto valido a conforto della ipotesi già da me formulata, consistente nel ritenere non coltivabili sui mezzi di cultura artificiale i batteroidi, mentre le relativamente poche colonie sviluppatesi sono con tutta probabilità da attribuirsi a microrganismi estranei accidentalmente capitati nel tubercolo.

So bene che un'obiezione apparentemente gravissima può muoversi contro tale interpretazione del risultato dei miei esperimenti: si può cioè affermare che tale risultato, come è stato più volte detto per spiegare consimili insuccessi, dipende da perdita della « virulenza » del microrganismo coltivato in serie su mezzi artificiali. Or bene, io non voglio rispondere che tale spiegazione, in ultima analisi, si riduce a una semplice affermazione, senza una base posi-

tiva di fatti che stiano a provare questa pretesa perdita di virulenza, e nemmeno insisto sulla stranezza di ammettere — *contrariamente a ciò che si constata di tutti i microrganismi patogeni conosciuti*, — che pochissimi passaggi, nel corso di pochi giorni, su mezzi di cultura in cui il bacillo sviluppa rigogliosissimo, determinino un completo cambiamento delle sue attitudini biologiche, ciò che appare anche più strano se si tien conto che i batteroidi rimasti per ugual periodo di tempo, sia pure senza svilupparsi, nel medesimo ambiente di cultura, mantenevano integro il loro potere produttore dei tubercoli! Io posso trascurare tutto ciò dal momento che, come or ora si vedrà, il progredire delle mie ricerche mi ha permesso di isolare un microrganismo il quale anche dopo ripetuti passaggi sui mezzi di cultura mantiene affatto intatta la sua « virulenza » comportandosi come i batteroidi negli esperimenti di infezione delle piante di fava!

ESPERIMENTO I.

Data dell'inizio dell'esperimento	Indicazioni relative alla coltivazione	Data del termine dell'esperimento	Risultato dell'esame delle radici
20 gennaio 1906	1° Coltivazione di controllo senza nessuna aggiunta	29 marzo 1906	Nessuna traccia di tubercoli sulle radici, normalmente sviluppate
Id.	2° Id. id. id. id.	20 aprile 1906	
Id.	3° Id. id. con aggiunta di emulsione di tubercoli di fava	29 marzo 1906	Numerosi piccoli tubercoli contenenti batteroidi
Id.	4° Coltivazione con aggiunta di sospensione del bacillo n. 1, isolato da 22 giorni dalla piastra, e passato 4 volte in gelatina di fava	Id.	Nessuna traccia di tubercoli. Radici normalmente sviluppate
Id.	5° Seconda coltivazione come il n. 4°	20 aprile 1906	
Id.	6° Coltivazione con aggiunta di sospensione del bacillo n. 2, isolato da 15 giorni dalla piastra, e passato 5 volte in gelatina di fava	Id.	
Id.	7° Coltivazione con aggiunta di sospensione di batteroidi, ripresi da piastra di gelatina di fava, rimasta completamente sterile, dopo 14 giorni dall'infezione	Id.	Tubercoli scarsi ma evidentissimi e contenenti batteroidi
Id.	8° Seconda coltivazione come il n. 7°	Id.	Numerosi piccoli tubercoli con batteroidi

ESPERIMENTO II.

Data dell'inizio dell'esperimento	Indicazioni relative alla coltivazione	Data del termine dell'esperimento	Risultato dell'esame delle radici
28 gennaio 1906	1° Coltivazione di controllo senza nessuna aggiunta	13 aprile 1906	Nessuna traccia di tubercoli
Id.	2° Id. id. id. id.	Id.	
Id.	3° Id. id. con aggiunta di emulsione di tubercoli di fava	Id.	Numerosi tubercoli con batteroidi
Id.	4° Coltivazione con aggiunta di bacillo n. 3 isolato da 20 giorni dalla piastra e passato 5 volte in gelatina di fava	Id.	Nessuna traccia di tubercoli
Id.	5° Seconda coltivazione come il n. 4°	Id.	
Id.	6° Coltivazione con aggiunta di bacillo n. 4, isolato da 15 giorni dalla piastra e passato 4 volte in gelatina di fava	Id.	
Id.	7° Seconda coltivazione come il n. 6°	Id.	
Id.	8° Coltivazione con aggiunta di miscuglio dei quattro bacilli (4° e 5° passaggio su gelatina di fava)	Id.	
Id.	9° Coltivazione con aggiunta di sospensione di batteroidi ripresi da piastra di gelatina di fava, che dopo 12 giorni dall'infezione presentava solo 2 colonie	Id.	Tubercoli scarsi ma evidentissimi, e contenenti batteroidi
Id.	10° Seconda coltivazione come il n. 9°	Id.	

ESPERIMENTO I.

Data dell' inizio dell' esperimento	Indicazioni relative alla coltivazione	Data del termine dell' esperimento	Risultato dell'esame delle radici
20 gennaio 1906	1° Coltivazione di controllo senza nessuna aggiunta	29 marzo 1906	Nessuna traccia di tubercoli sulle radici, normalmente sviluppate
Id.	2° Id. id. id. id.	20 aprile 1906	
Id.	3° Id. id. con aggiunta di emulsione di tubercoli di fava	29 marzo 1906	Numerosi piccoli tubercoli contenenti batteroidi
Id.	4° Coltivazione con aggiunta di sospensione del bacillo n. 1, isolato da 22 giorni dalla piastra, e passato 4 volte in gelatina di fava	Id.	Nessuna traccia di tubercoli. Radici normalmente sviluppate
Id.	5° Seconda coltivazione come il n. 4°	20 aprile 1906	
Id.	6° Coltivazione con aggiunta di sospensione del bacillo n. 2, isolato da 15 giorni dalla piastra, e passato 5 volte in gelatina di fava	Id.	
Id.	7° Coltivazione con aggiunta di sospensione di batteroidi, ripresi da piastra di gelatina di fava, rimasta completamente sterile, dopo 14 giorni dall' infezione	Id.	Tubercoli scarsi ma evidentissimi e contenenti batteroidi
Id.	8° Seconda coltivazione come il n. 7°	Id.	Numerosi piccoli tubercoli con batteroidi

ESPERIMENTO II.

Data dell'inizio dell'esperimento	Indicazioni relative alla coltivazione	Data del termine dell'esperimento	Risultato dell'esame delle radici
28 gennaio 1906	1° Coltivazione di controllo senza nessuna aggiunta	13 aprile 1906	Nessuna traccia di tubercoli
Id.	2° Id. id. id. id.	Id.	
Id.	3° Id. id. con aggiunta di emulsione di tubercoli di fava	Id.	Numerosi tubercoli con batteroidi
Id.	4° Coltivazione con aggiunta di bacillo n. 3 isolato da 20 giorni dalla piastra e passato 5 volte in gelatina di fava	Id.	Nessuna traccia di tubercoli
Id.	5° Seconda coltivazione come il n. 4°	Id.	
Id.	6° Coltivazione con aggiunta di bacillo n. 4, isolato da 15 giorni dalla piastra e passato 4 volte in gelatina di fava	Id.	
Id.	7° Seconda coltivazione come il n. 6°	Id.	
Id.	8° Coltivazione con aggiunta di miscuglio dei quattro bacilli (4° e 5° passaggio su gelatina di fava)	Id.	
Id.	9° Coltivazione con aggiunta di sospensione di batteroidi ripresi da piastra di gelatina di fava, che dopo 12 giorni dall'infezione presentava solo 2 colonie	Id.	Tubercoli scarsi ma evidentissimi, e contenenti batteroidi
Id.	10° Seconda coltivazione come il n. 9°	Id.	

ESPERIMENTO III.

Data dell'inizio dell'esperimento	Indicazioni relative alla coltivazione	Data del termine dell'esperimento	Risultato dell'esame delle radici
2 febbraio 1906	1° Coltivazione di controllo senza nessuna aggiunta	7 aprile 1906	
Id.	2° Id. id. id. id.	Id.	Nessuna traccia di tubercoli
Id.	3° Id. id. con aggiunta di emulsione di tubercoli di fava	Id.	Tubercoli numerosi con batteroidi
Id.	4° Coltivazione con aggiunta di sospensione di batteroidi ripresi da piastre di gelatina semplice ancora apparentemente sterili dopo 14 giorni dall'infezione	Id.	
Id.	5° Seconda coltivazione come il n. 4°	Id.	Piccoli tubercoli contenenti batteroidi
Id.	6° Terza coltivazione come il n. 4°	Id.	

9. — Nuove ricerche circa la coltivabilità del microrganismo produttore dei tubercoli. — Dimostrazione della sua specificità.

Mentre i riferiti esperimenti erano in corso, io avevo continuato, ad onta della grande incertezza dei primi risultati, i tentativi di cultura del b. radicicola. E in uno di questi esperimenti ebbi occasione di osservare un fatto nuovo, il quale doveva del tutto mutare l'orientamento delle mie ricerche.

Esaminando al microscopio, per rilevare la presenza dei batteroidi, alcune piastre di gelatina semplice e di gelatina di fava, sulle quali dopo dodici giorni dalla seminagione non si vedevano che scarsissime colonie che avevano raggiunto ormai il loro completo sviluppo, mi accorsi che framezzo all'abbondante materiale dei batteroidi si notavano, disseminati su tutta la superficie della piastra, numerosi punticini piccolissimi (affatto invisibili ad occhio nudo) fortemente rifrangenti la luce, finamente granulosi, e che esaminati a più forte ingrandimento (coll'obiettivo 8) si presentavano di forma circolare e composti di un piccolo numero di corpiciattoli di forma molto irregolare, alcuni globosi, altri un po' allungati, altri grossolanamente ramificati. Colpito da tale osservazione, mi proposi di tener d'occhio nei giorni seguenti le piastre e di prepararne molte altre, con diversi materiali, per controllare l'eventuale ripetersi di simile reperto. In breve, senza stare a riferire l'andamento minuto di tali ricerche, proseguite da febbraio ad aprile, ne espongo senz'altro le conclusioni quali risultano da un numero ormai rilevantissimo di esperienze del tutto concordi.

Quando l'esame microscopico dimostra che i tubercoli sono ripieni di batteroidi integri, le piastre (come già ho detto e come ho anche di poi ripetutamente osservato) danno rapidamente sviluppo a un numero abbastanza scarso di colonie che — almeno in molti casi — non hanno nulla a che fare col microrganismo produttore dei tubercoli: i batteroidi rimangono affatto immutati sulle piastre di gelatina, agar, ecc., anche quando si possono continuare ad osservare per 20-30 e più giorni.

Ma quando le piastre sono infettate con materiale in cui cominciano a comparire le forme vacuolizzate dei batteroidi, le cose vanno diversamente. Intanto, in questo stadio, lo sviluppo delle colonie suaccennate è in generale assai più scarso, e le piastre molto più spesso restano apparentemente sterili. E in questo caso le culture

potendosi tenere lungamente in osservazione, verso il 7°-9° giorno comincia la comparsa di quelle piccole formazioni nelle quali è impossibile non riconoscere delle vere e proprie colonie. Un punto che — intanto — può essere stabilito nel modo il più sicuro — e che già basterebbe per far ritenere come quasi certo che tali colonie si sviluppano dai batteroidi vacuolizzati, è quello dell'assoluto parallelismo sempre constatato tra la presenza e il numero dei batteroidi vacuolizzati e delle colonie. Queste, mancanti quando l'esame microscopico del contenuto del tubercolo non fa rilevare che batteroidi integri, cominciano a comparire quando qualche batteroide si vacuolizza, e assumono uno sviluppo imponente, sono addirittura innumerevoli, allorquando tutto il materiale batteroico è completamente vacuolizzato. Ma v'ha di più: si può infatti molto facilmente seguire coll'esame microscopico la trasformazione del batteroide che dà luogo alla formazione della colonia.

I batteroidi vacuolizzati, trasportati sulla gelatina di fava, rimangono inalterati nei primissimi giorni, ma ben presto sembra aver luogo come una esagerazione del processo di vacuolizzazione. e nello stesso tempo si inizia un processo di disgregazione; dimodochè il batteroide, o i batteroidi se più di uno si è venuto a fissare in un medesimo punto della gelatina, perdono la loro forma tipica e si trasformano in un piccolo ammasso amorfo di corpiciattoli irregolarmente sferoidali (v. fig. 5 da un preparato per impressione, colorato con violetto di genziana, fatto 2 giorni dopo la seminagione della piastra). Un lento processo di moltiplicazione si inizia allora, tanto che verso il 6°-8° giorno si è costituito già un piccolo ammasso di tali corpiciattoli composti ancora di pochi individui e di forma irregolare (v. fig. 6 da un preparato per impressione colorato, e fig. 7 che riproduce una fotografia fatta direttamente dalla piastra); ma poco dopo si ha già la forma rotonda caratteristica della moltiplicazione in colonia (v. fig. 8 presa direttamente da una piastra in 10ª giornata, ove si vedono anche numerose forme di batteroidi non vacuolizzati che sono rimasti immutati, senza dar luogo a formazione di colonia). Progredendo lo sviluppo, le colonie, pur mantenendosi sempre microscopiche aumentano di dimensioni, mantenendosi rotondeggianti e molto fortemente granulose a piccolo ingrandimento (v. fig. 9) mentre il forte ingrandimento le dimostra formate dei soliti corpuscoli di forma svariata, ma prevalentemente globosa (con presenza evidentissima *anche di forme grossolanamente ramificate*) i quali appaiono conglobati da una sostanza amorfa, trasparente, e, come si deduce dalle succes-

sive culture macroscopiche, di aspetto gelatinoso, filante. La presenza di questa sostanza che ravvolge gli individui costituenti la colonia, fin dai primi stadi di formazione di questa, si rileva specialmente bene nei preparati per impressione colorati nei quali i singoli corpuscoli appaiono immersi nella sostanza stessa, che si colora molto intensamente coi colori di anilina, e delimita i contorni della colonia (v. fig. 10 da un preparato per impressione, colorato).

A questo punto le cose vanno diversamente a seconda del substrato nutritivo; infatti un ulteriore sviluppo non sembra verificarsi sulle piastre di gelatina semplice; invece sulle piastre di gelatina di fava le colonie continuano ad ingrandire, fino a raggiungere, dopo un tempo assai variabile (da 12-15 giorni fino a 1 mese e più dopo l'innesto) a seconda di condizioni non ancora ben definite, dimensioni tali da rendersi visibili ad occhio nudo, come piccoli punticini di aspetto ialino, rilevati, non fondenti la gelatina. Ed anche nella costituzione di tali colonie — sebbene il risultato finale come or ora vedremo sia affatto identico — si osserva una certa variabilità le cui cause dovranno essere ulteriormente meglio accertate, ma che probabilmente dipendono da differenze non ancora potute apprezzare, del mezzo nutritivo o della temperatura di sviluppo, ecc. Infatti, in 3 casi ho potuto osservare che, nelle piastre di gelatina di fava, di pari passo con lo ingrandirsi delle colonie, aveva luogo una trasformazione per cui, in seguito a una specie di processo di segmentazione, le forme rotondeggianti e irregolarmente ramificate si venivano man mano riducendo in forme bacillari che in fine costituivano tutta quanta la compagine della colonia. Molte altre volte (in almeno 8 diversi stipiti, isolati da altrettante piante) tale trasformazione non si verificò, o almeno avvenne solo parzialmente, le colonie essendosi sempre mantenute (per quanto si prolungasse il tempo dell'osservazione) composte di un miscuglio di forme assai irregolari, tra cui accanto a forme nettamente bacillari se ne vedevano altre globose, irregolarmente ramificate, ecc. Quale fosse la causa di tale diversità, non so per ora indicare, ma l'andamento ulteriore delle ricerche dimostra però indiscutibilmente che in tutti quanti i casi si trattava del medesimo microrganismo. Difatti per ciascuno degli 8 esemplari ultimamente ricordati furono dalle colonie sviluppate in piastra di gelatina di fava, fatti passaggi per infissione o per striscio in provette contenenti pure gelatina di fava. Lo sviluppo riuscì straordinariamente lento, solo dopo 8-10 giorni cominciò ad aversi, identico in tutti gli esem-

plari, lo sviluppo di una scarsa vegetazione, la quale solo dopo 20-25 giorni assunse un aspetto veramente caratteristico. Si vedeva cioè nel punto d'innesto una gocciolina di sostanza incolora, gelatinosa, filante, fortemente rilevata sulla superficie della gelatina e che racchiudeva e inglobava una discreta vegetazione microbica di colorito bianco cereo (v. fig. 11, da una cultura di circa un mese). Nei preparati microscopici la sostanza ricordata assumeva intensamente le colorazioni, ed in essa apparivano immerse le solite forme svariate (v. fig. 12).

Furono eseguiti 4 o 5 passaggi in serie, ed ogni volta lo sviluppo pur mantenendosi assai lento si andava facendo più rigoglioso, e nello stesso tempo le piccole goccioline di aspetto ialino assumevano una colorazione sempre più intensamente bianca come se la sostanza ravvolgente cedesse man mano il posto al progrediente sviluppo della massa microbica. E contemporaneamente i microrganismi tendevano sempre più ad assumere la forma bacillare, tanto è vero che nelle culture di 5°- 6° passaggio il microrganismo aveva assunto una forma simile a quella che molto più rapidamente, nei 3 surricordati esperimenti, si era direttamente sviluppata sulle piastre di gelatina di fava.

Si tratta di un bacillo di 0.5-0.6 $\times$ 2-3 μ che si colora bene coi comuni colori di anilina, non col metodo di Gram. Nelle culture molto recenti, diluite in acqua ed osservate in goccia pendente, si vedono molti individui mobili: ma non sono ancora riuscito a mettere in evidenza le ciglia che il microrganismo ha certamente, ma la cui colorabilità è resa estremamente difficile dalla presenza della ricordata sostanza gelatinosa ravvolgente i bacilli (*a*). Si osservano pure nelle culture recenti, evidentissime forme ramificate molto simili ai batteroidi (vedi fig. 13) e sebbene tali forme non si generalizzino, ma anzi dopo qualche giorno tendano a scomparire, la loro presenza anche fugace costituisce una riprova che il microrganismo deriva in realtà dai batteroidi. Un'altra analogia è questa: che i bacilli dopo qualche giorno cominciano a presentare dei vacuoli, dei punti cioè che non prendono il colore, assumendo così un aspetto che, astrazion facendo dalla forma non ramificata, ricorda esattamente i batteroidi vacuolizzati (vedi fig. 14 da un preparato colorato: data l'abbondanza, in questo stadio, della solita sostanza

(*a*) Cfr. le mie memorie sulla colorazione delle ciglia dei batteri. (Archivio per le scienze mediche, 1900, e Rivista d'igiene e sanità pubblica. 1902-1903).

gelatinosa, la microfotografia non è riuscita così chiara come le precedenti, ma i preparati sono assolutamente dimostrativi). Finalmente, nelle culture assai vecchie si ha la comparsa di grosse forme rotondeggianti, granulose, analoghe a quelle che i batteroidi vacuolizzati assumono se portate sui mezzi di cultura (vedi fig. 15). Ancora una singolare particolarità che completa il parallelismo tra i batteroidi e il microrganismo da me isolato, è data dal comportamento di questi sulla gelatina semplice peptonizzata. Ho già detto come su questo mezzo di cultura i batteroidi si trasformino in piccoli ammassi di corpuscoli più o meno irregolarmente sferici, senza nessuna ulteriore modificazione: ebbene le culture dei bacilli in questione, sviluppati su gelatina di fava, quando vengano trasportate su gelatina semplice, si comportano in modo assolutamente identico; i bacilli si trasformano molto rapidamente in grosse masse sferoidali fortemente granulose, che subiscono forse un lieve processo di riproduzione che però si arresta certo molto rapidamente (vedi fig. 16 riproducente un preparato colorato da cultura in gelatina semplice in terza giornata). Queste masse poi, riportate in gelatina di fava, si scindono e riproducono la forma batterica.

La ragione e il modo di manifestarsi di tale variabilità di forma dovranno essere più minutamente investigati, ma il fatto che si ripete con assoluta costanza, è indiscutibile.

Volli saggiare anche il modo di comportarsi del microrganismo su qualche altro dei principali mezzi di cultura, ma in brodo, in soluzioni saline, in agar comune, su patata e su carota, non osservai sviluppo apprezzabile macroscopicamente: all'esame microscopico osservai talora forme globose che verosimilmente non rappresentavano che un processo di trasformazione del materiale innestato. Volli allora saggiare anche l'innesto su materiali privi o molto poveri di sostanza azotata. Preparai perciò l'agar secondo la formula indicata dal Moore (vedi § 2). e una gelatina minerale a base di silice. Questa fu preparata partendo da silicato di soda del commercio addizionato di un volume uguale di acido cloridrico a 13° Baumé; il tutto sottoposto a dialisi fino a scomparsa della reazione dei cloruri nel liquido dializzato. La soluzione silicica, perfettamente limpida, così ottenuta, venne distribuita in provette (10 cmc. per ciascuna) e sterilizzata. Al momento dell'uso, si aggiungeva a ciascuna provetta mediante pipette graduate sterili 0.5 cmc. di una soluzione sterile di solfato di magnesia all'1 %; 0.5 cmc. di soluzione di fosfato monobasico di potassa al 0.5 % e 0.5 cmc. di soluzione all'1 % di cloruro di sodio. Circa una

mezz'ora dopo l'aggiunta dei sali, la silice era coagulata e vi si poteva fare l'innesto. In ambedue questi mezzi di cultura, il primo (agar Moore) assai scarso, il secondo (silice gelatinosa) privo affatto di azoto, il microrganismo vegeta rigoglioso a temperatura ambiente. dando luogo ad una tenue patina bianchiccia, molto diffusa, filante, composta di forme bacillari simili in tutto a quelle ottenute nelle culture di 5°-6° passaggio su gelatina di fava, e che, come queste, presentano le successive fasi di vacuolizzazione e di trasformazione in corpuscoli ingrossati, irregolarmente tondeggianti.

Alla temperatura di 37° non si ha sviluppo apprezzabile del microrganismo.

Stabilite così le principali caratteristiche morfologiche del microrganismo ed ottenutine facilmente i passaggi in serie, si presentava subito la necessità di controllare la sua specificità per mezzo dell'esperimento di infezione delle coltivazioni sperimentali. L'esperimento fu eseguito con modalità identiche a quelle degli esperimenti precedentemente descritti (§ 8), e che quindi è inutile ripetere. Le coltivazioni furono divise in 4 serie:

1ª serie comprendente 5 vasi con semi sterilizzati senza nessuna aggiunta di cultura;

2ª serie comprendente 5 vasi con semi sterilizzati e poi infettati con cultura pura (4° passaggio) di un microrganismo rapidamente sviluppatosi sulle piastre nel corso di questa 2ª serie di esperimenti e perfettamente identificabile colla specie n. 2 descritta nel § 8;

3ª serie comprendente 5 vasi con semi sterilizzati e infettati con cultura pura (6° passaggio) di uno degli esemplari, isolati dalla piastra da circa 60 giorni, del microrganismo da me descritto;

4ª serie comprendente 5 vasi con semi sterilizzati e infettati con cultura pura (7° passaggio) di un altro esemplare isolato da più di 2 mesi, dello stesso microrganismo.

L'esperimento fu iniziato il 20 aprile, e grazie alla temperatura elevata, lo sviluppo delle piante fu così rapido che già il 10 di giugno si poterono dissotterrare per esaminarne le radici. È inutile esporre in tabelle l'esito dell'esperimento, che si può così riassumere: risultato affatto negativo nelle piastre testimoni e in quelle infettate con cultura del bacillo n. 2; risultato brillantemente positivo (tutta la radice coperta di piccoli tubercoli ripieni di batteroidi di forma e aspetto perfettamente normali) nelle piante infettate coi due stipiti del microrganismo da me descritto.

Coi fatti riferiti lo studio dell'argomento non può dirsi esaurito.

Restano ancora da approfondire alcune particolarità culturali e biologiche del microrganismo isolato, e sopratutto è da ricercare se le sue culture sono eventualmente capaci di fissare l'azoto atmosferico: resta da sperimentare se i risultati favorevoli, per ciò che riguarda la formazione dei tubercoli nelle coltivazioni sperimentali, sono confermati, nell'applicazione alla pratica agricola, da una benefica influenza sulla cultura delle leguminose: resta infine da estendere la ricerca a tutte le altre specie di leguminose. A tutti questi quesiti cercherò di rispondere quanto prima mi sia possibile, con ulteriori ricerche in parte già iniziate, ma mi è sembrato intanto opportuno riferire quanto ho potuto mettere in sodo, poichè qualunque possa essere il risultato degli studi ulteriori, sino da ora *la specificità del microrganismo da me isolato, come produttore dei tubercoli deve ritenersi accertata sulla base dei seguenti fatti:*

a) constatazione del passaggio della forma tipicamente bacillare (non ramificata) inizialmente esistente nei tubercoli, nella forma di batteroide integro (forma ramificata) e successivamente in quella di batteroide vacuolizzato;

b) coltivabilità in serie di quest'ultima forma di batteroide vacuolizzato, su speciali substrati nutritivi artificiali con produzione di una forma bacillare essenzialmente uguale a quella iniziale del tubercolo (*a*);

c) presenza, nelle culture del microrganismo, di forme ramificate assai numerose ricordanti molto da vicino i batteroidi; successiva trasformazione delle forme bacillari *affatto analoga* a quella osservata nei batteroidi (vacuolizzazione, ingrossamento);

d) riproduzione costante dei tubercoli nelle coltivazioni sperimentali di fave, infettate coi prodotti delle culture pure di 6°-7° passaggio.

***

Dopo aver dimostrato che, coltivando il materiale dei tubercoli sugli appositi terreni nutritivi, si ha spesso il rapido sviluppo di colonie non differenziabili da quelle comunemente descritte come

(*a*) Nessuna importanza, a questo riguardo, ha la mancanza di mobilità dei bacilli dei tubercoli, essendo noto che la mobilità è un carattere il quale, sebbene stabile e ben determinato per ciascuna forma batterica, è però in stretto rapporto colle condizioni dell'ambiente e può molto spesso mancare affatto in determinate circostanze. È noto che la mobilità e la presenza di ciglia in alcuni microrganismi patogeni (per es. nel b. del tifo) sono verificabili solo nelle culture, e in speciali condizioni, non nei microrganismi esistenti nel corpo dell'infermo.

appartenenti al b. radicicola Bejerinck, ma che per serie ragioni sono da ritenersi come il risultato di inquinamento da parte di germi banali del suolo, e dopo avere (sulla base di osservazioni positive contraddicenti affermazioni affatto ipotetiche di precedenti AA.), precisato il ciclo biologico del vero microrganismo produttore dei tubercoli, sembra ozioso il fermarsi a discutere se questo microrganismo sia stato mai precedentemente isolato da altri. Certo non hanno avuto a che fare con esso, tutti quelli, e costituiscono l'enorme maggioranza, i quali attribuendo i loro insuccessi alla pretesa perdita di virulenza dei microrganismi coltivati in serie, non sono riusciti ad ottenere la riproduzione sperimentale dei tubercoli. D'altra parte i pochi che avrebbero ottenuto risultati positivi da culture pure di microrganismi *rapidamente sviluppantisi nei mezzi di cultura* si dividono in due categorie:

1ª quelli che parlano di riproduzione dei tubercoli per mezzo di culture di 1° passaggio nelle quali, per le ragioni più volte esposte, abbondano i batteroidi provenienti dal primitivo materiale d'innesto e capaci di per sè di riprodurre i tubercoli, il che toglie ogni valore alle conclusioni di questi AA.;

2ª i pochissimi i quali sembra abbiano constatato la proprietà tubercoligena delle culture trapiantate in serie per varie volte: ma questi (cito ad esempio il Moore) nell'esporre poi i caratteri fondamentali della specie riproducono essenzialmente la descrizione del bacillo di Bejerinck che, come abbiamo visto, non può assolutamente accettarsi, facendo così nascere il sospetto che, tutto al più, abbiano avuto a che fare con culture impure.

Tutto considerato dunque, e tenendo presente che il microrganismo da me isolato sviluppa tardivamente sui mezzi nutritivi, che ha caratteri morfologici e culturali ben determinati e che anche nelle culture lungamente trapiantate in serie mantiene intatto il suo potere tubercoligeno, appare chiaro che nessuna delle specie descritte dai precedenti AA. poteva considerarsi come l'agente specifico produttore dei tubercoli delle leguminose.

10. — Conclusioni.

1° L'esame microscopico del contenuto dei tubercoli della fava in stadio iniziale di sviluppo, mostra la presenza di forme bacillari ben definite delle dimensioni di $0.5\text{-}0.6 \times 2\text{-}3\ \mu$, le quali non tardano a modificarsi, assumendo le speciali forme ad Y, conosciute sotto il nome di *batteroidi*.

2° In progresso di sviluppo del tubercolo si nota in alcuni batteroidi una specie di vacuolizzazione, avendosi degli spazi rotondeggianti non colorabili separati da masse cromatiche: questo fenomeno presto si generalizza, interessando la totalità dei batteroidi.

3° I batteroidi così vacuolizzati, che non possono considerarsi come prodotti di degenerazione, ma rappresentano un vero e proprio stadio progressivo dello sviluppo del microrganismo, subiscono col tempo una certa modificazione di forma, che ricorda però sempre quella primitiva. Un passaggio consecutivo di queste forme di batteroidi vacuolizzati a bacilli nell'interno dei tubercoli non si è mai potuto osservare.

4° L'innesto del materiale interno dei tubercoli su gelatina nutritiva a base di estratto di leguminose, con o senza aggiunta di peptone, saccarosio, ecc., eseguito con le più scrupolose cautele per evitare un eventuale inquinamento da parte dei germi del terreno imbrattanti la superficie del tubercolo, dà spesso luogo a rapido sviluppo di colonie, alcune delle quali per i caratteri propri e dei microrganismi che le compongono, dovrebbero ascriversi alla specie *b. radicicola Bejerinck*, ma che non sono capaci in cultura pura, di dar luogo alla produzione di tubercoli nelle coltivazioni sperimentali, e che probabilmente devono interpretarsi come il risultato di inquinamento da parte di germi banali del suolo.

5° I batteroidi non ancora vacuolizzati, sullo stesso terreno nutritivo rimangono affatto inattivi, senza subire alcun processo di accrescimento o di riproduzione, ma ripresi dalla superficie delle piastre, dopo un lungo periodo di tempo, 15-20 giorni, sono capaci di dare luogo a produzione di tubercoli nelle coltivazioni sperimentali.

6° I batteroidi vacuolizzati, sempre nelle stesse condizioni di cultura, dànno luogo, molto lentamente, a sviluppo di colonie caratteristiche. Tali colonie si sviluppano costantemente dal materiale contenente batteroidi vacuolizzati, e in numero proporzionale al numero di questi, presentandosi 6-10 giorni dopo l'innesto come piccoli punticini finamente granulosi: crescono molto lentamente divenendo assai tardi (dopo 15-20 giorni o più) visibili ad occhio nudo. La trasformazione dei batteroidi negli ammassi di piccoli corpuscoli che costituiscono il primo accenno della colonia può facilmente controllarsi coll'osservazione microscopica.

7° I corpuscoli di forma irregolarmente globosa, bacillare o ramificata che costituiscono la colonia sviluppata dal batteroide possono coltivarsi in serie su gelatina all'estratto di fava, in cui sviluppano dapprima lentamente e poi con sempre maggiore rigoglio,

evolvendosi contemporaneamente verso la forma bacillare che predomina verso il 4°-5° passaggio. Nelle culture su mezzi poveri o privi di azoto tale passaggio alla forma bacillare è molto più rapido. Invece in gelatina peptonizzata si stabilisce una forma globosa immutabile ma che ha solo uno sviluppo molto scarso. Anche negli altri comuni terreni di cultura il microrganismo o non sviluppa o sviluppa molto scarsamente. In nessun mezzo di cultura si ha sviluppo a 37°.

8° La forma bacillare stabilitasi nei passaggi su gelatina di fava, su agar al maltosio, su gelatina di silice, è mobile, si colora coi comuni colori di anilina, non col metodo di Gram, ed ha aspetto simile a quella osservata negli stadi iniziali di formazione del tubercolo. Nelle culture a un certo stadio di sviluppo sono assai frequenti le forme con un'estremità un po' ingrossata e quelle ramificate ricordanti molto da vicino i batteroidi. Il fatto non si generalizza, ma invece si verifica costantemente in tutti i microrganismi un processo di vacuolizzazione assolutamente identico a quello che si ha nei batteroidi.

9° Le culture pure di 6°-7° passaggio di tale microrganismo danno luogo a imponente formazione di tubercoli radicali negli esperimenti di coltivazione in terreni previamente sterilizzati e poi infettati colle culture stesse.

10° Il microrganismo da me isolato, i cui caratteri morfologici, biologici e culturali si differenziano notevolmente da quelli — pur così vaghi ed incerti — generalmente attribuiti al bacillo radicicola Bejerinck, è il primo esemplare di cultura pura tubercoligena nettamente individualizzata secondo le norme positive della tecnica batteriologica e sicuramente affermata nella sua specificità.







FIG. 13.

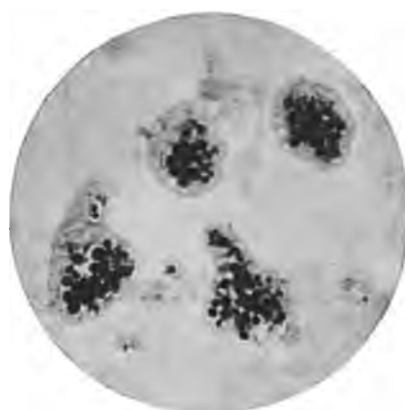


FIG. 16.

Fig. 14. Preparato microscopico colorato c. s. dalla stessa cultura della fig. 13, ma in stadio più avanzato di sviluppo (9° giorno dopo l'innesto) in cui i bacilli si sono vacuolizzati. L'abbondanza della sostanza gelatinosa involgente i bacilli rende meno chiara la microfotografia Ingrandimento c. s.

Fig. 15. Preparato microscopico colorato c. s. dalla solita cultura delle fig. 13 e 14, ma in stadio anche più avanzato (14° giorno dopo l'innesto); si osservano numerose forme grosse, rotondeggianti o ellittiche. Ingrandimento c. s.

Fig. 16. Preparato microscopico colorato c. s. da cultura in gelatina semplice peptonizzata nel 3° giorno dopo l'innesto della forma bacillare, che si è trasformata nella forma nettamente sferoidale.

BIBLIOGRAFIA.

1. PLINIUS. *Historia naturalis*, L. VIII.
2. VARRO. *De Re rustica*, I. 23.
3. THAER. *Rationelle Landwirtschaft*, 1809 B. I.
4. BOUSSINGAULT. *Mémoires de Chimie agric. et de Physiologie*, Paris 1854.
5. GILBERT LAWES e PUGH. Philos. Trans. Roy. Soc. London, 1861, cit. da MOORE (92).
6. VILLE. Comp. rend. acad. scienc. Paris 1852-54-55, cit. da MOORE (92).
7. SCHULTZ LUPITZ. *Die Kalidungung auf leichtem Boden*. Berlin, 1883.
8. BERTHELOT. *La fixation de l'azote atmosphérique sur la terre végétale*. Annales de chimie, XIII, p. 5. Cfr. del medesimo autore numerosissime memorie, sullo stesso argomento nei Compt. Rendus de l'ac. d. sc.
9. HELLRIEGEL. *Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote?* Tageblatt der 59. Vers. deutsch. Naturforsch. u. Aertze in Berlin, 1886.
10. HELLRIEGEL u. WILLFAHRT. *Untersuchungen ueber die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen*. Beilageheft zu der Zeitsch. des Vereins für Rübenzuckerindustrie des Deutschen Reiches. Berlin, 1888.
11. FRANK. *Untersuchungen über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff und über den Kreislauf derselben in der Landwirtschaft*. Landwirtsch. Jahrbücher, XVII, 1888.
12. FRANK. *Zur Kenntnis der Assimilation elementaren Stickstoffes*. Berichte d. deutschen botan. Gesellsch. VII, 1889.
13. FRANK. *Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen*. Berichte der deutsch. botan. Gesellschaft. VII, 1889.
14. FRANK u. OTTO. *Untersuchungen über Stickstoffsassimilation in der Pflanze*. Berichte der deutsch. botan. Gesellschaft. VIII, 1890.
15. FRANK. *Zuvieweit ist der freie Luftstickstoff für die Ernährung der Pflanzen verwertbar?* Deutsch. landw. Presse, 1891, n. 77.
16. FRANK u. OTTO. *Ueber einige neuere Versuche betreffs der Stickstoffs assimilation in der Pflanze*. Deutsch. landw. Presse. 1891, n. 41.
17. FRANK. *Ueber die auf Verdauung von Pilzen abzielende Symbiose der mit endotrophen Mycorrhizen begabten Pflanzen*, ecc. Berichte d. deutschen botan. Gesellsch., IX, 1891, n. 7.
18. FRANK. *Die Assimilation freien Stickstoffes bei den Pflanzen in ihrer Abhängigkeit von Species*, ecc. Landw. Jahrb., XXI, 1892.
19. FRANK. *Die Assimilation des freien Stickstoffes durch die Pflanzenwelt*. Botanische Zeit., 1893, I.
20. LAWES und GILBERT. *New experiments on the question of the fixation of free Nitrogen*. Proceed. of the Royal Soc. London, XLVII, 1890.
21. PETERMANN. *Recherches de chimie et physiologie appliquées à l'agriculture*. T. II., Bruxelles-Paris, 1894.
22. ATWATER u. WOODS. *The acquisition of atmospheric nitrogen by plants*. Amer. chemic. Journ. XIII, 1891.
23. SCHLOESSING et LAURENT. *Recherches sur la fixation de l'azote libre par les plantes*. Annales de l' Inst. Pasteur, 1892.

24. Mattirolo. *Sulla influenza che l'estirpazione dei fiori esercita sui tubercoli radicali delle piante leguminose.* Malpighia, 1899.
25. Delechamps. *Historia generalis plantarum*, 1586.
26. Malpighi. *Opera omnia. Anatomia plantarum.* Pars II. *De Gallis.* 1687.
27. Wulffen. *Ueber den Anbau der weissen Lupine im nordlichen Deutschland.* Magdeburg, 1828.
28. De Candolle. *Mémoire sur la famille des Légumineuses.* 1825.
29. Trinchinetti. *Sopra alcuni tubercoli che rinvengonsi sulle radici dell'Arachys Hypogaea.* Biblioteca italiana, 1837, p. 288.
30. Citati da Prazmowski. Landwirtsch. Versuchsstationen, XXXVII.
31. Clos. *Ebauche de la rhizotaxie.* Paris, 1848. *Du collet dans les plantes et de la nature de quelques tubercules.* Ann. scienc. nat., XII, 1849.
32. Gasparini. *Osservazioni sulla struttura dei tubercoli spongiolari di alcune piante leguminose.* Atti dell'accad. scien., Napoli, VI, 1851.
33. Trevisanus. *Ueber die Neigung der Hülsengewächse zur unterirdischen Knollenbildung.* Botan. Zeitung, 1853.
34. Kolackzeck. *Lehrbuch der Botanik.* 1856.
35. Lachmann. *Knöllchen an den Wurzeln der Leguminosen.* Zeitschr. d. landw. Lehranstalt zu Poppelsdorf, 1858.
36. Rautenberg u. Kühn. *Vegetationversuche im Sommer 1863.* Landwirthschaftl. Versuchsstationen, VI, 1864.
37. Woronin. *Ueber die bei der Schwarzerle und der gewöhnlichen Gartenlupine auftretenden Wurzelanschwellungen.* Mém. de l'acad. imp. des sciences de St. Pétersbourg. X, 1866.
38. Lecomte. *Les tubercules radicaux de l'arachide.* Compt. rend. CXIX. 1894.
39. Kirchner. *Die Wurzelknöllchen der Sojabohne.* Cohn' s Beitrag z. Biologie d. Pflanzen, VII, 1895.
40. Clos. *Caractéres extérieurs et modes de repartition des petites tubercules ou tuberculoïdes des légumineuses.* Comp. rend. CXXIII, 1896.
41. Clos. *Les tuberculoïdes des légumineuses*, ecc. Bulletin de la Soc. botan. de France, Sez. III, T. VI, 1899.
42. Thiel. *Mitteilung über die Frage der Leguminosenknöllchen.* Jahrb. d. deutsch. Landwirtsch. Gesellsch., XI, 1896.
43. Jonse. *Les endophites radicaux de quelques plantes javanaises.* Annales du jardin botanique de Buitenzorg, XIV, 1896.
44. Mottareale G. *Di alcuni organi particolari delle radici tubercolifere dello Hedysarum coronarium*, ecc. Atti R. Istituto d'incoraggiamento. Napoli, 1898.
45. Paratore. *Ricerche istologiche sui tubercoli radicali delle leguminose.* Malpighia, XII, 1899.
46. Paratore. *Sul polimorfismo del Bacillo radicicola Bejerinck.* Malpighia. XV, 1902.
47. Paratore. *Ricerche sulla struttura e le alterazioni del nucleo nei tubercoli radicali delle leguminose.* Malpighia, XV, 1902.
48. Dawson. *Further observations on the nature and functions of the nodules of leguminous plants.* Philosoph. Transact., Botany, 1900.
49. Belisòn. *Les nodosités des légumineuses.* Cooper. agricol., 1900.
50. Life. *The tuber-like rootslets of Cycas revoluta.* Botanic. Gazette. 1901.

51. Gross. *Die americanische Kuherbse, Cow Pea, (Vigna catiang)*, ecc. Oesterr. ungarische Zeitschr. f. Zucker Industrie, ecc., 1902.

52. Laurent. *Observations sur le développement des nodosités radicales chez les légumineuses.* Compt. Rend. Ac. Scien. CXXXIII, 1901.

53. Marchal. *Influence des sels mineraux nutritifs sur la production des nodosités chez le Pois.* Compt. Rend.. CXXXIII, 1901.

54. Trotter. *Intorno ai tubercoli radicali di Datisca cannabina.* Boll. della Soc. botanica italiana, 1902.

55. Beijerinck. *Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen.* Botan. Zeitung, 1888.

56. Hiltner. *Ueber die Bedeutung der Wurzelknöllchen von Alnus glutinosa für die Stickstoffernährung dieser Pflanze.* Landwirthsch. Versuchsstat., XLVI.

57. Id. *Ueber Entstehung und physiologische Bedeutung der Erlenknöllchen.* Forstl. naturwissenschaftl. Ztschr., 1897.

58. Nobbe u. Hiltner. *Vermögen auch nicht Leguminosen freien Stickstoff aufzunehmen?* Landwirth. Versuchsstat., LXVI, 1894.

59. De Vries. *Wachstumsgeschichte des roten Klees.* Landw. Jahrb., VI, 1877.

60. Brunchorst. *Ueber die Knöllchen an den Leguminosenwurzeln.* Berichte der deutschen botan. Gesellsch., III, 1885.

61. Frank. *Die Stickstofffrage vor, auf und nach der Naturforscherversammlung zu Berlin.* Deutsche landwirthschaftl. Presse, 1886.

62. Id. *Sind die Wurzelanschwellungen der Erle und Elaeagnaceen Pilzgallen?* Berichte der deutschen botan. Gesellsch., V, 1887.

63. Schindler. *Ueber die biologische Bedeutung der Wurzelknöllchen bei den Papilionaceen.* Journal f. Landwirthschaft., XXXIII, 1885.

64. Tschirch. *Beiträge zur Kenntnis der Wurzelknöllchen der Leguminosen.* Berichte d. deut. bot. Gesellsch., VII, 1887.

65. Strecker. *Die Bereicherung des Bodens durch den Anbau bereichernder Pflanzen.* Journ. f. Landwirtschaft., XXXIV, 1886.

66. Benecke. *Ueber die Knöllchen den Leguminosenwurzeln.* Botan. Centralbl., 1887.

67. Mattirolo. *I tubercoli radicali delle leguminose.* Malpighia, I, 1887.

68. Mattirolo e Buscaglioni. *Si contengono batteri nei tubercoli radicali delle leguminose?* Malpighia, I, 1887.

69. Vuillemin. *Les tubercules radicales des légumineuses.* Annales de la science agronomique, V, 1888.

70. Van Tieghem et Douliot. *Origine, structure et nature morfologique des tubercules radicaux des légumineuses.* Bullet. Soc. botan. de France, XXXV, 1888.

71. Lundstroem. *Ueber Mikodomatien an den Wurzeln der Papilionaceen.* Botan. Centralbl., XXXIII, 1888.

72. Arcangeli. *Sopra i tubercoli radicali delle leguminose.* Rendic. Lincei, 1891.

73. Delpino. *Osservazioni sopra batteriocecidi e la sorgente di azoto in una pianta di Galega officinalis.* Malpighia, II, 1889.

74. Erikson. *Studien öfver leguminosernas rotknölar.* Rif. in Botanisches Zeitung, 1884.

75. Cornu. *Etude sur le phylloxéra.* Paris, 1878.

76. PRILLIEUX. *Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des légumineuses.* Bull. de la Société botan. de France, XXVI, 1879.

77. KNY. *Zu dem Aufsatze des Herrn prof. B. Frank « Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen ».* Botan. Zeitung, 1879.

78. SCHINDLER. *Zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Papilionaceen.* Botan. Centralblatt, 1884, XVIII.

79. PRAZMOWSKI. *Das Wesen und die biologische Bedeutung der Wurzelknöllchen der Erbse.* Ber. a. d. Sitzungen d. Akad. Krakau. — Botan. Centr., 1889.

80. BEJERINCK. *Over ophooping van atmospherische Stikstof in Culturen van bacillus radicicola.* Versl. en med. d. k. Akad., ecc. Amsterdam, 1891.

81. WARD. *On the tubercular swellings on the roots of Vicia Faba.* Philos. Trans. of the Royal Society of London, CLXXVIII, 1887.

82. BREAL. *Expériences sur la culture des légumineuses.* Annales agronomiqnes, X, 1889.

83. KOSSOWITSCH. *Durch welche Organe nehmen die Leguminosen den freien Stickstoff auf?* Botan. Zeitung, 1892.

84. WAGNER. *Stickstoffdungung der landwirthschaftlichen Kulturpflanzen.* Deutsche landw. Presse, 1893.

85. HELLRIEGEL. *Ueber Stickstoffnahrung landwirthschaftlicher Kulturgewächse.* Bericht auf dem internat. land- u. forstwissensch. Kongress zu Wien, 1890.

86. WILLFAHRT. *Ueber die Stickstoffaufnahme der Pflanzen.* Naturforscher Versammlung, 1890, Sekt. f. Agrikulturchemie.

87. GONNERMANN. *Die Bakterien in den Wurzelknöllchen der Leguminosen.* Landwirtsch. Jahrbucher, 1894.

88. MAZÉ. *Les microbes des nodosités des légumineuses.* Ann. Inst. Pasteur, 1898.

89. SMITH. *The nodule organism of the Leguminose.* Centr. f. Bakt., II Abt., VI, 1900.

90. CHIARIZIA. *Diagnosi differenziale di vari bacilli radiciculi.* Annali d'igiene sperimentale, XIII, 1903.

91. MOORE. *Bacteria and the Nitrogen Problem.* Jearb. of Dept. of agriculture, 1902.

92. ID. *Soil inoculations for legumes.* Washington Gouvernt. printing Office, 1905.

93. STUTZER. *Beiträge zur Morphologie der als Bakterium radicicula beschriebenen Organismen.* Mitt. der landw. Instit. der Kgl. Universität Breslau. 1900.

94. HILTNER. *Ueber die Bakteroiden der Leguminosenknöllchen und ihre willkürliche Erzeugung ausserhalb der Wirtspflanzen.* Centr. f. Bakt., II Abt., VI, 1900.

95. STUTZER. *Die Bildung von Bakteroiden in künstlichen Nährboden.* Centr. f. Bakt., Abt. II, VII, 1901.

96. NEUMANN. *Die Bakterien der Wurzelknöllchen der Leguminosen.* Landwirth. Versuchsstationen, LVI, 1901.

97. SUCHTING. *Kritische Studien über die Knöllchebakterien.* Centr. f. Bakt. Abt. II, XI.

98. Berthelot. *Recherches nouvelles sur les microorganismes fixateurs de l'azote.* Compt. rend. Acad. Paris, CXII, 1893.
99. Heinrich. Citato da Stutzer (102).
100. Stutzer, Burri, Maul. *Untersuchungen über das Anpassungsvermögen von Bacillus radicicola,* ecc. Centr. f. Bakt., II Abt., 1896.
101. Mazé. *Fixation de l'azote par le bacille des nodosités des légumineuses.* Ann. Inst. Pasteur, 1897 e 1899.
102. Stutzer. *Neuere Arbeiten über die Knöllchenbakterien der Leguminosen.* ecc. Centr. f. Bakt., II Abt., I, 1895.
103. Winogradski. Citato da Stutzer (102).
104. Immendorf. *Beitrage zur Losung der Stickstofffrage.* Landw. Jahrb., XXI, 1892.
105. Beijerinck. *Kunstliche Infektion von Vicia Faba mit Bacillus radicicola,* ecc. Botan. Zeitung, 1890.
106. Salfeld. Citato da Stutzer (102).
107. Nobbe, Schmidt, Hiltner, Hotter. *Versuche über Stickstoffassimilation der Leguminosen.* Landwirtsch. Versuchstat., XXXIX, 1891.
108. Nobbe, Hiltner, Schmidt. *Versuche über die Biologie der Knöllchenbakterien der Leguminosen,* ecc. Landwirtsch. Versuchstat., XLV, 1895.
109. Nobbe u. Hiltner. *Ueber die Anpassungfähigkeit der Knöllchenbakterien ungleichen Ursprungs an verschiedenen Leguminosengattungen.* Landwirtsch. Versuchstat., XLVIII, 1896.
110. Nobbe. *Bodenimpfung mit reinkultivierten Knöllchenbakterien für die Kultur von Leguminosen.* Naturwissenschaftl. Gesellschaft. Isis, Dresden, 1897.
111. Id. *Einige neuere Beobacht. betreffend die Bodenimpfung mit reinkultivierten Wurzelknöllchenbakterien für die Leguminosen Kultur.* Verhandl. d. Gesellsch. deut. Naturforscher u. Aerzte, 68 Versammlung.
112. Nobbe u. Hiltner. *Ueber die Dauer der Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien an bestimmte Leguminosengattungen.* Landwirtsch. Versuchstat., XLIX, 1898.
113. Id. *Ueber die Verteilungsfähigkeit der Leguminosenbakt.* (ivi, 1892).
114. Id. *Wodurch werden die Knöllchen besitzenden Leguminosen befähigt, den freien atmosph. Stickstoff für sich zu verwenden* (ivi, 1893).
115. Stutzer. *Neuere Arbeiten über die Knöllchenbakterien der Leguminosen,* ecc. Centr. f. Bakt., II Abt., II.
116. Nobbe u. Hiltner. *Kunstliche Ueberführung der Knöllchenbakterien von Erbsen in solche von Bohnen.* Centr. f. Bakt., II Abt., VI, 1900.
117. Buhlert. *Untersuchungen über Arteinheit der Knöllchenbakterien der Leguminosen und über die landwirthschaftliche Bedeutung dieser Frage.* Centr. f. Bakt. II. Abt., IX, 1902.
118. Hiltner. *Ueber die Ursachen, welche die Grösse, Zahl, Stellung und Wirkung der Wurzelknöllchen der Leguminosen bedingen.* Arbeiten aus d. Biol. Abteilung f. Land-u. Forstwirthsch. am Kais. Ges.-Amte, I, 1900.
119. Buhlert. *Ein weiteren Beitrag zur Frage der Arteinheit der Knöllchenbakterien der Leguminosen.* Centr. f. Bakt., II Abt., IX.
120. Jacobitz. *Ueber Stickstoffsammelnde Bakterien,* ecc. Munch. med. Woch., 1902.

121. Schneider. *A new factor in economic agriculture.* Agric. Exp. Stat. Illinois, 1893.
122. Schneider. *The morphology of root tubercles of Leguminosae.* Botan. Centralbl., LVIII, 1894.
123. Schneider. *Observations sur quelques Rhizobiums américains.* Rev. Mycologique, 1895.
124. Schneider. *Beitrag zur Kenntnis der Rhizobien.* Berichte d. Deut. Bot. Gesell., 1894.
125. Bolley. *Note on root tubercles of indigenous and exotic legumes in virgin soil of Northwest.* Agricultural science, VII, 1893.
126. Hiltner u. Störmer. *Neuere Untersuchungen über die Wurzelknöllchen und deren Erreger.* Arb. a. d. Biol. Abt. f. Landw-u. Forstwirth. am k. Ges.-Amte, III, 1903.
127. Schmitter. *Die Impfung des Lehmbodens zu Lupinen mit bacterienreicher Erde.* Inaug. Diss. Heidelberg, 1893.
128. Vrieze. *Kann man mittels Lehm Leguminosepilze einimpfen.* Deutsch. Landw. Presse, XXII, 1895.
129. Salfeld. *Die Wirkung von Lehm aus dem Untergrunde und von Seeschlick und die Knollenbakterien der Leguminosen.* Deut. Landw. Presse, XXII, 1895.
130. Salfeld. *Vernichtet Aetzkalk die Leguminosepilze auf hohem leichten Sandboden?* Hannoversche land-u. fortwirthsch. Zeitung, LIII, 1900.
131. Salfeld-Lungen. *Vernichtung der Leguminosenpilze durch Aetzkalk.* Deutsche Landw. Presse, 1894.
132. Take-Immendorf. *Ueber das Verhalten der Bakt. der Leguminosenknöllchen gegen Aetzkalk.* Mitteil. d. Ver. z. Forderung der Moorkultur, 1895.
133. Meyer. *Zur Bodenimpfung mit Bakterien für Leguminosen.* Zeitschrift f. oeffentl. Gesundsheitspflege, 1897.
134. Richter. *Zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen.* Landwirthsch. Versuchsstat., LI, 1899.
135. Thiele. *Zur Verbreitung der Leguminosenbakt.* Fuhling's Landw. Zeitung, 1900.
136. Grandeau. *L'inoculation du sol et les légumineuses.* Journ. d'agricult. pratique, 1901.
137. Schulze. *Serradella und Kalk.* Deutsche Landwirthsch. Presse, XXIX, 1902.
138. Wohltmann. *Die Knollchenbakterien in ihrer Abhängigkeit von Boden und Düngung.* Journ. f. Landwirthschaft., L, 1902.
139. *Die Bodenimpfung für Leguminosen mit reinkultivierten Bakterien.* Farbwerke vorm. Meister Lucius und Brüning in Höchst, 1897.
140. Luberg. *Impfversuch mit Nitragin bei Serradella.* Deut. Landw. Presse 1897.
141. Frank. *Die bisher erzielten Ergebnisse der Nitraginimpfung.* Landwirth. Versuchsstat., LI, 1899.
142. Wollny. *Versuche über die Wirkung des Nitragins.* Vierteljahrschr. des bayer. Landwirtsch., 1898.
143. Dawson. *Nitragin and the nodules of leguminous plants.* Philosoph. Transact. of the R. Soc. of London, CXCII.

144. DAWSON. *On the economic importance of Nitragin.* Annals of Botany, 1901.

145. EDLER. *Versuche über die Wirkung von Nitragin*, ecc. Deutsch. Landw. Presse, 1899.

146. STOKLASA u. SEMPOLOWSKI. *Versnche mit Nitragin und Alinit.* Ivi, 1899.

147. LUTOLAWSKI. *Beitrag zur Lehre von der Stickstoffernährung der Leguminosen.* Ber. a. d. physiol. Labor. u. d. Versuchsanst. d. Landwirth. Inst. d. Univ. Halle, 1900.

148. BURCHARDT. *Wenn und wie ist das Nitragin vom Landwirt anzuwenden, um eine Steigerung des Ertrages seiner Leguminosen zu erzielen?* Landwirthsch. Wochenbl. f. Schleswig-Holstein, 1900.

149. KÜHN. *Wirkung des Nitragins* ecc. Zeit. f. Landw. der Prov. Sachsen, 1896.

150. HALSTEAD. *Experiments with « nitragin »* ecc. Report of the botan. Depart. of the New Jersey agric. coll. exper. stat., 1899.

151. HENSOLT. *Die Bakterien im ihrer Bedeutung für Acker-und Pflanzenbau.* Landw. Annalen d. Mecklemb. patriot. Vereins, 1901.

152. REMY. *Ueber die Steigerung der Stickstoffsammlungsvermogens der Hülsenfrüchte durch bakterielle Hilfsmittel.* Deut. Landw. Presse, 1901.

153. FRUHWIRTH. *Versuche über Hülsenfruchtfolge und Impfung.* Zeitschr. f. d. Landwirthsch. Versuchsstat. im Oesterreich, 1902.

154. ROSATI. *L'inoculazione nel suolo dei batteri delle leguminose*, ecc. Bollettino ufficiale del Ministero di agricoltura, ecc., 1902.

155. THIELE. *Ein Beitrag zur Impfung der Leguminosen mit Nitragin.* Zeitschr. d. Landwirtschaftkammer d. Prov. Schlesien, 1902.

156. NOBBE u. HILTNER. *Wie lässt sich die Wirkung des Nitragins erhöhen?* Landwirtsch. Versuchsstat., LI, 1899.

157. NOBBE u. HILTNER. *Ueber die Wirkung der Leguminosenknöllchen in der Wasserkultur.* Landwirtsch. Versuchsstat., LI, 1899.

158. HILTNER. *Bodenimpfung mit Reinkulturen oder mit rohen Boden?* Deutsche Landwirthsch. Presse, 1899.

159. NOBBE u. HILTNER. *Ueber den Einfluss verschiedener Impfstoffmengen auf die Knöllchenbildung und der Ertrag von Leguminosen*, Landwirth, Versuchsstat., 1901.

160. HILTNER. *Die Keimungsverhältnisse der Leguminosensamen*, ecc. Arb. a. d. Biol. Abt. f. Landw-u. Forstwirtsch. am Kais. Ges.-Amte III, 1902.

161. NOBBE e RICHTER. *Ueber den Einfluss des Nitratstickstoff und der Humussubstanzen auf den Impfungserfolg bei Leguminosen.* Landwirth. Versuchsstat., LVI, 1902.

162. HILTNER. *Ueber die Impfung der Leguminosen mit Reinkulturen.* Deut. Landw. Presse, 1902.

163. HILTNER. *Ueber neuere Ergebnisse auf den Gebiete der Bodenbakteriologie.* Centr. f. Bakt. II Abt., X, 1903.

164. HILTNER. *Ueber die Impfung der Leguminosen mit Reinkulturen und ihre praktische Bedeutung.* Centr. f. Bakt., II Abt., X, 1903.

165. GRÜNER. *Utilizzazione dell'azoto atmosferico.* Annuario scientifico ed industriale, XLII, 1905, Milano, Fratelli Treves.



Per le notizie della tecnica rimando il lettore alla mia già citata memoria sulle emolisine nella malaria umana: qui mi accontento di darne un sunto e di aggiungere qualche altro particolare d'importanza per le ricerche fatte sul sangue del cane.

La massa corpuscolare del sangue defibrinato, separata per centrifugazione dal siero, lavai con soluzione sterile di NaCl 1 % per tre volte, facendo naturalmente seguire ad ogni nuova aggiunta di soluzione una centrifugazione di 20′ e la separazione del liquido soprastante. Un cmc. del cruore così lavato dissolvevo in 9 cmc. di acqua distillata sterilizzata, centrifugavo in provette con fondo conico, decantavo il liquido soprastante laccato, e il sedimento biancastro soffice sospendevo in tanta soluzione sterile di NaCl 0.91 %, quanta ne occorreva per ristabilire il volume primitivo.

Di tale sospensione mi sono sempre servito in queste esperienze. Nella memoria sulle emolisine nella malaria umana ho chiamato *estratto acquoso* il liquido risultante dal dissolvimento dei corpuscoli per opera dell'acqua distillata: e alle due parti nelle quali l'estratto acquoso si separa colla centrifugazione ho dato il nome di *sedimento* e di *liquido soprastante laccato*. Ma siccome nelle seguenti esperienze ho sempre adoperato il sedimento risospeso, così ad esso soltanto, in questa nota, intendo di riferire la denominazione *estratto acquoso*.

Tutte queste operazioni vanno fatte col maggior possibile rigore per rispetto alla sterilità del materiale di studio e dei recipienti.

Le mescolanze delle emazie lavate e degli estratti acquosi e dei sieri furono fatte in provettine sterilizzate. In ogni provetta mettevo cmc. 0.10 di sangue e cmc. 1.90 di una miscela di estratto acquoso o di siero con soluzione di NaCl 0.91 %, fatta in modo che in cmc. 1.90 si contenesse la voluta quantità di estratto o di siero. Le provette erano messe in termostato a 37° C. per 12h; l'osservazione era fatta ogni due ore fino alla sesta ora, e finalmente dopo la dodicesima.

In queste esperienze le soluzioni di NaCl ben si prestano come liquido di sospensione delle emazie di bue e di cavallo; ma per le emazie del cane v'è un inconveniente, che non permette alcun giudizio sicuro sull'esito delle esperienze. Le emazie del cane, spessissimo, vanno incontro ad autolisi nelle soluzioni di NaCl 0.91-1 %, quando si mantengono alla temperatura di 37° C.; ne consegue che anche nella provetta di controllo si ha emolisi, e quindi viene a mancare il termine di confronto per le provette, nelle quali avvengono le reazioni emolitiche. Solo rare volte ciò non mi è accaduto: nel cane la resistenza delle emazie è molto varia, e sembra spesso essere in rapporto colla razza, talora soltanto dipendere da una disposizione individuale. Il NaCl, in certe dosi, è tossico per le emazie del cane, secondo alcune mie osservazioni che pubblicherò in altro lavoro: mi premeva dunque di trovare una soluzione di una o più sostanze, che non dimostrasse azione tossica nelle condizioni sperimentali da me scelte. Ne ho tentate parecchie, e sarebbe superfluo il parlarne;

mi è riuscita migliore di tutte una *miscela a parti eguali di una soluzione di NaCl 1 % e di una soluzione di saccarosio 9.70 %*.

In questa miscela l'autolisi non avviene, o avviene in misura così debole, da permettere sempre un confronto abbastanza sicuro.

I. — Ricerche nella piroplasmosi del cane.

Il virus col quale i cani furono inoculati, sempre nella cavità peritoneale, proviene dall'Istituto delle malattie tropicali di Amburgo.

La forma clinica assunta dall'infezione nei cani è ora acuta, ora cronica, in relazione più con la razza degli animali che con la loro età: la emoglobinuria si è avuta molto di rado, raramente un ittero gravissimo, spesso ittero lieve.

La ricerca di sostanze emolitiche fu fatta in sette cani. In uno di questi potei ripetere tre volte il salasso, in vari intervalli durante l'infezione, e preferisco di esporre anzi tutto le indagini fatte sul sangue di esso, perchè più facilmente e più brevemente potrò poi dire dell'esito delle ricerche fatte negli altri cani.

26 aprile 1906. Raccolta dalle vene dell'orecchio destro di pochi cmc. di sangue in palloncini, contenenti piccole palline di vetro levigate, e sterilizzati: agitazione per 10'.

Dopo la presa del sangue, inoculazione intraperitoneale di sangue contenente pirosomi, estratto da un cane infetto.

I saggi d'emolisi fatti sul sangue di questo cane, raccolto prima dell'inoculazione, ebbero questo risultato:

l'estratto acquoso ed il siero non ebbero azione emolitica apprezzabile sulle emazie dello stesso cane.

Il 29 aprile si notò in circolo scarso numero di pirosomi. Si eseguì un piccolo salasso colle regole dell'asepsi e senza alcuna sorta di narcosi, dalla carotide destra. Contemporaneamente si cavò sangue anche ad un cane sano.

I saggi questa volta dimostrarono *un'azione emolitica dell'estratto acquoso, forte sulle emazie dello stesso cane, mediocre sulle emazie del cane sano.*

Il siero non ebbe azione emolitica, nè sulle emazie dello stesso cane infetto, nè su quelle del cane sano.

Il controllo presentò un certo grado di autolisi, che non si era osservato nel sangue estratto dal cane prima dell'infezione sperimentale. A questo proposito è da avvertire che gli apprezzamenti del grado dell'emolisi furono fatti per comparazione con una scala colorimetrica allestita collo stesso sangue adoperato nelle esperienze.

Il 3 maggio l'esame microscopico del sangue dimostrò scarsi pirosomi, intraglobulari ed estraglobulari: nei due giorni precedenti erano però stati un po' più numerosi. Fu eseguito un altro piccolo salasso dalla arteria crurale destra, senza narcosi. Contemporaneo salasso fu fatto ad un cane sano.

Risultato dei saggi emolitici:

L'estratto acquoso manifestò un'azione emolitica netta, ma un po' inferiore a quella che aveva dimostrata nella precedente esperienza, tanto sulle emazie dello stesso cane, quanto su quelle del cane sano (azione autolitica ed isolitica).

Il siero manifestò anch'esso un'azione autolitica ed isolitica: questa proprietà è dunque comparsa *ex novo*, non essendosi mai prima rivelata.

Anche il controllo presentò un mediocre grado di emolisi, inferiore però sempre a quello osservato nelle provette di reazione coll'estratto e col siero.

In nessuno degli altri cani mi fu possibile di fare più di un salasso dopo l' inoculazione, per lo più a causa del progresso rapido dell'infezione provocata; infatti in 5 dei cani esaminati l'infezione ebbe decorso acuto.

Per ciò che riguarda l'estratto acquoso si è in tutte le esperienze confermata la sua azione autolitica ed isolitica nel periodo in cui vi sono scarsi pirosomi circolanti. Tuttavia devo aggiungere che una mediocre azione emolitica dell' estratto acquoso si è manifestata in due casi anche prima dell'infezione sperimentale; dopo questa però, l'azione emolitica risultò maggiore. È da notare che in tutti e due questi casi l'infezione ebbe un decorso rapidissimo, terminando con forte tinta itterica di tutti gli organi e con grave dissoluzione del sangue, e in uno di essi anche con emoglobinuria. Forse nel determinare la comparsa di così profonde alterazioni ha influenza una speciale disposizione individuale dei globuli rossi del sangue.

In un altro caso l'azione emolitica dell'estratto acquoso fu fortissima, tanto che già dopo due ore non v'era più traccia di emazie integre nelle corrispondenti provette: ora in questo caso fu anche notato che nel controllo avvenne un'autolisi completa dopo 4 ore. Su questa coincidenza di fatti ritornerò più oltre.

Azione emolitica nel siero non mi fu dato di provare in nessuno di questi cani, salvo nel primo. Anzi importa conoscere che, tranne in questo caso, *il siero ha avuto un'azione inibitrice del potere emolitico degli estratti, o vogliamo dire protettiva delle emazie*. Quest'azione antiemolitica si manifesta anche se il siero è presente in quantità piuttosto piccole, e precisamente quando esso costituisce la decima

o anche la ventesima parte del volume totale del liquido nel quale sono sospese le emazie.

Vuolsi avvertire che anche il siero di sangue di cane sano ha azione antiemolitica, e deve certo contribuire alla protezione delle emazie contro l'azione di sostanzee molitiche eventualmente presenti o capitate nel sangue circolante in certe condizioni.

II. — Ricerche nella piroplasmosi dei bovini.

Ho potuto studiarne 4 casi (1). Le ricerche furono fatte secondo lo schema indicato per la piroplasmosi canina. La diagnosi clinica di piroplasmosi fu confermata dalla necroscopia di alcuni capi della stessa tenuta, morti di emoglobinuria, e dall'esame microscopico del sangue, che riuscì negativo solo in un caso, nel quale la diagnosi del resto era accertata da altri fatti.

Per escludere l'eventuale influenza di un'infezione mista di piroplasmosi e carbonchio, fu eseguito l'esame batteriologico del sangue dei bovini presi in esame e della milza di alcuni capi già morti: l'esito di queste ricerche fatte a scopo diagnostico fu in tutti i casi negativo. Il salasso fu fatto dalla giugulare.

Due degli animali avevano però già ricevuto iniezioni di chinina. Ma questo alcaloide presente nel sangue estratto dall'animale per effetto di iniezioni già fatte non ha per sè alcuna azione emolitica *in vitro*, e d'altra parte non impedisce sensibilmente la manifestazione dell'emolisi dovuta ad altre cause. Per ciò queste esperienze mantengono il loro valore, nonostante la chinizzazione degli animali.

Eccone il risultato.

In due dei bovini, che non erano stati chinizzati e che nel momento del salasso erano itterici e febbricitanti, *fu notata l'azione autolitica ed isolitica dell'estratto acquoso.*

Il siero di sangue di essi non solo non ebbe azione emolitica, ma esercitò l'azione inibitrice, di cui è stato già discorso.

Anche il controllo dimostrò emolisi, che rimase di poco inferiore a quella della provetta con gli estratti.

Negli altri due bovini, già chinizzati, gli estratti acquosi non ebbero alcuna azione autolitica nè isolitica. Uno di essi febbricitava

---

(1) Ringrazio vivamente il prof. Valentini e il dott. Caviglia, che mi hanno cortesemente favorito procurandomi il materiale di studio.

(temperatura rettale nel momento del salasso 40.2°C); l'altro era già stato gravemente colpito, ma nel momento della raccolta del sangue era apiretico e stava, si può dire, per uscire di malattia.

Da notare che il sangue del bue febbricitante era fluidissimo, e, dopo la centrifugazione, circa quattro quinti del volume totale erano rappresentati da siero.

Il siero di questo bue febbricitante esercitò una forte azione emolitica sul sangue dell'altro bue, in convalescenza, ma *non ebbe alcun effetto sulle emazie dello stesso bue.*

III. — Ricerche in un caso di piroplasmosi del cavallo.

La diagnosi fu confermata al microscopio. Il cavallo febbricitava nel momento del salasso e, 2 ore prima, aveva ricevuto del chinino per iniezione intravenosa. Le ricerche fatte nel solito modo dimostrarono quanto segue:

L'estratto acquoso ha azione emolitica fortissima sulle emazie dello stesso cavallo, tanto da dare emolisi completa dopo appena due ore.

Il siero, contenente pigmenti biliari, *non manifestò alcuna azione autolitica; al contrario esercitò un'azione inibitrice.*

Il controllo mostrò emolisi completa già dopo sei ore.

***

Comparando i risultati delle esposte esperienze, e lasciando da parte alcuni particolari in apparenza discordanti, possiamo dire che *l'estratto acquoso del cruore del cane, del bue e del cavallo, affetti da piroplasmosi, ha spessissimo un'azione emolitica sulle emazie dello stesso animale.*

Tale azione si può talora osservare, benchè più debole, anche nel sangue di cani sani.

Il sangue dei detti animali affetti da piroplasmosi, ben lavato e sospeso in soluzione isosmotica di NaCl (bue, cavallo) o di miscela di NaCl e saccarosio (cane) va spesso incontro al fenomeno dell'autolisi, la quale non si osserva quasi mai, nelle condizioni sperimentali da me adottate, per il sangue di animali della stessa specie, quando sono sani.

Il siero di sangue dei detti animali malati esercita un'azione protettiva sulle emazie, tanto contro l'autolisi spontanea, quanto contro l'azione degli estratti acquosi: solo in due casi (in un cane e in un bue) ebbe azione emolitica, più precisamente isolitica; nel cane anche autolitica.

Questo insieme di fatti s'accorda sostanzialmente con quanto ho osservato nella malaria umana e ci fa pensare che la dissoluzione del sangue in queste infezioni avviene per opera di speciali sostanze emolitiche, sul cui meccanismo d'azione non posso ancora dir nulla, ma che non sono certo in rapporto nè colla presenza, nè col numero dei parassiti circolanti nel sangue. Non si può però asserire se esse siano, tutte o in parte, direttamente elaborate o no dai parassiti stessi, quantunque dalle esperienze fatte nella malaria umana la prima ipotesi appaia meno probabile.

Comunque abbiano origine queste sostanze emolitiche, esse si fissano subito alle emazie, provocandone il dissolvimento: dalla gran quantità di emazie distrutte in primo tempo si liberano di nuovo le sostanze emolitiche, le quali possono restare in eccesso nel plasma, e quindi sono dimostrabili nel siero *in vitro*.

Ciò fanno supporre l'esperienza sul sangue del bue febbricitante, e quella fatta sul sangue del 1° cane. Il siero avrebbe sempre una funzione protettiva, salvo che la scarica delle sostanze emolitiche liberate dalla massa delle emazie distrutte non la sopraffaccia del tutto, conferendo al siero potere emolitico.

Il trovare quindi le sostanze emolitiche nell'estratto o nel siero dipenderebbe, più che altro, dal tempo nel quale si raccoglie il sangue da studiare.

Che delle aptine specifiche possano prima fissarsi agli elementi cellulari, producendone il dissolvimento o la disgregazione, e, dopo aver causato questi effetti, rendersi novamente libere ed essere pronte a ricominciare la loro azione su altri elementi, è provato dalle esperienze di Pfeiffer e Friedberger sulle batteriolisine del v. del colera. Gli ambocettori batteriolitici, dopo aver operato la distruzione dei vibrioni, si possono rendere liberi, conservando intatta la loro azione specifica, che può estrinsecarsi su altri vibrioni. Analogamente le *emolisine* da me studiate, prodotte *ex novo* nell'organismo infetto, si fissano da prima alle emazie, e, dopo averne distrutte un gran numero, si rendono libere nel plasma sanguigno.

Ho già iniziato nuove ricerche per vedere come più precisamente si svolga questo processo e quale sia il destino ultimo delle emolisine.

Istituto d'Igiene della R. Università di Roma

Intorno al passaggio degli anticorpi nel latte e al loro assorbimento per la mucosa intestinale

per il dott. **DANTE DE BLASI,** aiuto e docente. (*)

Lo studio del passaggio degli anticorpi nel latte e dell'assorbimento di essi per il canale digerente dei poppanti, quasi del tutto abbandonato dopo le prime ricerche di Brieger ed Ehrlich, Brieger e Cohn, Ketscher, Ehrlich e Wassermann (12) e rimesso poi in campo dalle ormai famose comunicazioni del Behring (2-3) sulle vie di penetrazione del B. della tubercolosi, ha dato origine a molte indagini sperimentali, dai cui risultamenti appare la questione meno semplice di quel che sembrasse in principio. Infatti molteplici condizioni hanno influenza sui due fenomeni del passaggio nel latte e dell'assorbimento intestinale; e siccome le condizioni, nelle quali i vari autori hanno sperimentato, sono per la maggior parte diverse, così anche diverse sono le conclusioni, talora di tanto da sembrare perfino discordi.

Essendo già tre anni che attendo a ricerche sperimentali di tal genere, con particolare riguardo all'immunizzazione contro le infezioni intestinali dei bambini, espongo anzi tutto le mie esperienze, i cui risultati metterò poi a confronto con quelli di altri autori, per

---

(*) Il dott. F. Costantini, nel 1905, ha cooperato per ciò che riguarda la tecnica nelle prime tre esperienze sulle capre; simile cooperazione nelle ultime tre esperienze sulle capre ha avuto il dott. C. Rampagni nel 1906.

raccogliere e coordinare i fatti bene accertati fino ad oggi, e vedere se e in quali casi e fino a qual punto si possa sperare in utili applicazioni alla pratica.

Nella mia nota « Sul passaggio degli anticorpi nel latte e loro riassorbimento per l'intestino dei lattanti », presentata per il Congresso di Pediatria in Roma nell'ottobre 1904 (1) riferii alcune esperienze fatte su gatte e coniglie, allo scopo di vedere quale influenza avesse sul passaggio degli anticorpi nel latte e sull'assorbimento per il canale intestinale dei poppanti l'immunizzazione passiva o attiva delle madri. Per ricercare l'influenza dell'immunizzazione passiva adoperai siero antidifterico o siero antidissenterico Celli; per l'immunizzazione attiva mi servii di colture di B. dissenterico Celli e di B. del tifo. Dai risultati di queste esperienze conchiusi che *la natura dell'immunità che si conferisce all'animale allattante influisce sul passaggio degli anticorpi nel latte e nell'organismo dei poppanti*, e precisamente che

1° se l'immunizzazione della madre è passiva, i poppanti non acquistano un grado d'immunità sufficiente per resistere all'inoculazione di una dose sicuramente letale di veleno o di coltura batterica;

2° se l'immunizzazione è attiva, gli anticorpi non solo passano nel latte, ma attraversano la mucosa gastrenterica dei poppanti in quantità sufficiente a neutralizzare l'effetto di una dose sicuramente letale di coltura batterica.

Perciò nelle successive esperienze abbandonai il metodo dell'immunizzazione passiva e mi accinsi a studiare se i risultati incoraggianti ottenuti nel coniglio e nel gatto, si ripetessero in animali lattiferi di mezza e di grossa taglia, e se eventualmente il latte di questi meritasse di acquistare un'importanza pratica nell'immunizzazione dei poppanti.

Gli animali d'esperimento sono stati 5 capre ed una vacca, gentilmente messa a mia disposizione dal signor Serafini.

Le ricerche propostemi erano le seguenti:

1°. Determinare i poteri specifici agglutinante e battericida, *in vitro* e *in vivo*, del siero dell'animale lattifero, prima e dopo l'immunizzazione;

2°. Determinare gli stessi poteri nel latte fornito dagli animali immunizzati, prima e dopo l'immunizzazione;

3°. Determinarli nel siero o di piccoli poppanti o di animali adulti, ai quali si facesse ingerire il latte degli animali immunizzati. tanto prima quanto dopo la somministrazione del latte;

4°, 5°, 6°. Studiare il comportamento degli stessi poteri specifici in una serie d'esperienze analogamente fatte, ma adoperando per

(1) V. Riv. di Clin. ped. anno III, n. 1 e Ctbl. f. Bakt., Bd. XXXVI, I Abt. Ref. N. 12-13.

l'immunizzazione, invece di uno stipite solo, due stipiti batterici della stessa specie;

7°, 8°, 9°. Studiare i rapporti immunizzatorii fra stipiti virulenti e stipiti avirulenti.

Prima di riferire le esperienze fatte, dirò poche cose intorno alla

I. Tecnica adoperata.

a) *Immunizzazione e salassi.* — Prima dell'immunizzazione le capre furono sottoposte a rigorosa osservazione quotidiana, con principale riguardo allo stato generale, alla temperatura rettale, alla quantità e qualità del latte fornito ed agli eventuali fenomeni di reazione locali e generali susseguenti alle inoculazioni. Le capre furono tenute separate l'una dall'altra nelle migliori condizioni possibili di alimentazione e di ricovero.

Per l'immunizzazione furono sempre adoperate fresche colture su agar, stemperate in soluzione sterile di NaCl 0.85 %: le inoculazioni furono fatte sotto la cute della regione degli ipocondri. Il sangue occorrente per i saggi dell'agglutinazione e dell'azione battericida si otteneva mediante piccoli salassi, eseguiti con lancettine sterilizzate alla fiamma, dalle vene del padiglione dell'orecchio, prima raso e deterso con alcool ed etere, e poi lavato con soluzione sterile di NaCl; il sangue si raccoglieva in pipette Roux sterili e si centrifugava subito per 10', separandone così buona quantità di siero, quasi sempre limpido.

Il latte si raccoglieva in matracci Erlenmeyer sterili, dopo la disinfezione delle mammelle e delle mani del mungitore, e poi si metteva a filtrare attraverso triplo filtro di carta sterilizzato, essendo mantenuto alla temperatura di circa 12° C.; il filtrato, leggermente albescente, era adoperato nelle esperienze del giorno successivo.

b) *Agglutinazione.* — L'agglutinazione fu eseguita nei vari rapporti, per ciascun siero e per ciascun latte. Nei soliti tubetti da sierodiagnosi, del diametro interno di circa 7 mm., si mettevano 0.9 cmc. di una emulsione di patina su agar di 20 h in soluzione di NaCl al 0.85 %.

Uno di questi tubetti, riportato al volume di 1 cmc. con aggiunta di 0.1 cmc. di soluzione, serviva da controllo; negli altri si aggiungeva 0.1 cmc. di siero o di latte, oppure 0.1 cmc. di una diluzione di essi, fatta con la stessa soluzione salina in modo che in 0.1 cmc. si contenesse la quantità di liquido attivo calcolata per ottenere i rapporti necessari. Per rapporti più forti di 1:10 si facevano le seguenti miscele:

0,5 cmc.	siero	o	latte	+ 0,5 cmc.	soluz.	NaCl.	0.85 %	per 1:2
0,25 cmc.	»	»	»	+ 7,5 cmc.	»	»	»	per 1:4
0,2 cmc.	»	»	»	+ 0,8 cmc.	»	»	»	per 1:5
0,10 cmc.	»	»	»	+ 0,90 cmc.	»	»	»	per 1:10

ed in ciascun tubetto si emulsionava un'eguale quantità di germi; tutti i tubetti, dopo essere stati agitati, erano tenuti in stufa a 37° C. per 2 h: poi alla temperatura del refrigerante per le ore seguenti. L'osservazione, ma-

croscopica, era fatta dopo mezza ora, e ripetuta dopo un'ora, due ore, sei ore; solo per l'agglutinazione del latte l'osservazione fu ripetuta anche dopo la dodicesima ora.

c) *Azione battericida* in vitro. — In tubetti, nei quali era stata messa la voluta quantità di siero o di latte ed aggiunta della soluzione sterile di NaCl al 0.85 % fino al volume totale di 1 cmc., si emulsionava un'ansa normale di patina su agar di 20 h; dopo agitazione, i tubetti erano tenuti per 6 h in termostato a 37° C e di nuovo agitati prima di procedere all'allestimento delle piastre.

Per queste adoperavo 10 cmc. di agar, e seminavo un'ansa normale prelevata da ciascun tubetto. Se non che, con questo metodo, la conta delle colonie, eseguita anche dopo 12 h, dava per i controlli cifre superiori di molto a 100,000, rendendo assai difficile l'apprezzamento di una eventuale diminuzione. Preferii quindi diluire un'ansa normale in 1 cmc. di soluzione di NaCl sterile. Allo scopo tenevo preparati nella stufa a 37° C altrettanti tubetti contenenti 1 cmc. della detta soluzione, nei quali stemperavo l'ansa normale: per avere una diffusione più omogenea dell'emulsione mettevo questi tubetti di nuovo in termostato per 10', agitavo e ne seminavo nell'agar fluidificato un'ansa normale. Il conteggio delle colonie si faceva dopo 24 h; nelle piastre con battericidia molto forte anche dopo 48 o 62 h. Usando sempre il microscopio, con ingrandimento di circa 65 diametri, si contava il numero di colonie che si trovava nei vari campi, dei quali si osservava un buon numero, per poterne dedurre una media possibilmente esatta; questa media, moltiplicata per il numero dei campi microscopici contenuti in una piastra, dava il numero totale delle colonie. Per stabilire il numero dei campi microscopici contenuti in una piastra si determinava la superficie del campo microscopico mediante la misurazione del diametro col micrometro obbiettivo; per questa superficie si divideva la superficie della piastra. Essendo questa costante per tutte le piastre che adoperavo ed uguale a mmq. 6358, ed essendo col sistema ottico adoperato (ob. Koristka 2, oc. Huyg. 3, lunghezza 16 cm.) il diametro del campo microscopico uguale a mmq. 2.24, il numero dei campi microscopici contenuti in una piastra era uguale a 1478.

d) *Azione battericida* in vivo. — Come animale da esperimento scelsi la cavia giovane, di circa 250 gr., e come via di inoculazione la endoperitoneale. La dose da inoculare era prelevata da agar colture di 20 h, mediante l'ansa normale, ed emulsionata in 4 cmc. di brodo sterile; vi aggiungevo poi la voluta quantità di siero o di latte, o di loro diluzioni, in modo da ottenere in volume maneggevole quelle piccole quantità di liquido di cui volevo osservare l'effetto battericida. Naturalmente per ogni esperimento si inoculavano anche i necessari controlli.

II. Esperienze.

1. Capra.

Proveniente da Salisano Sabino, con un capretto dell'età di 12 giorni.
Fu immunizzata col *B. coli commune*. Il *B. coli* adoperato si conserva in questo Istituto da più di un anno, e proviene da Sassari, dove il prof. Vin-

conzi lo isolò da un'acqua inquinata. Questo stipite di *B. coli*, assai virulento dopo l'isolamento, aveva perduto di virulenza, e al principio di queste esperienze occorrevano due patine, inoculate nel peritoneo, per ottenere in capo a 24-48 ore la morte di una cavia del peso medio di circa 250 gr. Ne esaltai la virulenza, facendolo passare 8 volte di seguito attraverso il corpo delle cavie per inoculazione prima intraperitoneale, poi sottocutanea: ciò nonostante però non mi riuscì di raggiungere una virulenza superiore a quella che corrisponde a mezza patina per inoculazione intraperitoneale e ad una patina per inoculazione sottocutanea *(dose minima sicuramente letale)*. Col germe così esaltato furono eseguite tanto la immunizzazione della capra, quanto le esperienze occorrenti per saggiare il potere agglutinante e il battericida *in vitro* e *in vivo*.

Avendo già esposto i particolari della tecnica e le precauzioni adoperate, qui mi limito a riferire nel modo più semplice i risultati delle esperienze; all'esposizione cronologica dei fatti, preferisco la comparazione sinottica dei risultati delle osservazioni, fatte prima e dopo la immunizzazione, riguardanti:

a) il potere agglutinante del siero di sangue della capra;
b) il potere battericida *in vitro* del siero di sangue della capra;
c) il potere battericida *in vivo* dello stesso siero;
d) il potere agglutinante del latte;
e) il potere battericida del latte *in vitro*;
f) il potere battericida del latte *in vivo*;
g) il potere agglutinante del siero di sangue del capretto;
h) il potere battericida del siero di sangue del capretto *in vitro*;
i) il potere battericida del siero di sangue del capretto *in vivo*.

Protocolli e specchietti ingombrerebbero vanamente questa memoria; e però stimo più opportuno di ricordare solo i fatti importanti, coordinandoli in una esposizione critica riassuntiva.

Potere agglutinante del siero della capra. — Per ciò che riguarda il potere agglutinante, se conveniamo di prendere come rapporto limite quello nel quale l'agglutinazione avviene poco intensa, ma netta, dopo sei ore, dalle esperienze fatte risulta che l'effetto prodotto da 0.1 di siero prima dell'immunizzazione è eguale a quello prodotto da 0.0005 dopo l'immunizzazione. È dunque chiaro che il potere agglutinante è diventato $\frac{0.1}{0.0005} = 200$ volte più forte.

Potere agglutinante del latte. — Il potere agglutinante del latte, che prima della immunizzazione era nullo, dopo l'immunizzazione ha raggiunto il titolo di circa 1:20, sicchè il rapporto tra la carica di agglutinine del latte e quella del siero è di $\frac{1}{2000} : \frac{1}{20} = 1 : 100$. Bisogna però notare che il potere agglutinante del latte, saggiato durante il periodo della immunizzazione, aveva dimostrato un titolo più forte; la prima volta (dopo la 2ª inoculazione) di 1:80, la seconda (dopo la 4ª inoculazione) di 1:100. Per il secondo caso, il rap-

porto quantitativo tra le agglutinine del latte e quelle del siero è di 1 : 20.

Potere agglutinante del siero del capretto. — Il potere agglutinante del siero del capretto, che prima della immunizzazione della madre aveva il titolo di 1 : 5, dopo l'immunizzazione della madre ha raggiunto un titolo compreso tra 1 : 10 e 1 : 20. L'acquisto della proprietà agglutinante è dunque così piccolo, che sarebbe lecito considerarlo più che altro come un fatto fisiologico dipendente dall'accrescimento del capretto, tanto più che anche il siero della capra adulta possiede normalmente per il *B. coli* adoperato un debole potere agglutinante, corrispondente a 1 : 10 circa.

Possiamo dunque affermare che le agglutinine sono passate nel latte della madre, ma in quantità molto inferiore a quelle che sono dimostrabili nel siero di sangue, laddove non possiamo con sicurezza asserire se le agglutinine comparse nel latte abbiano realmente attraversato la mucosa gastrenterica del poppante.

Potere battericida del siero della capra. — Quanto al potere battericida *in vitro* del siero della madre, esso era insignificante, quasi nullo, prima dell'immunizzazione; dopo questa è bensì cresciuto, ma non in modo rilevante.

In vivo invece il siero si è dimostrato più attivo giacchè 0.1 cmc. di esso ha salvato una cavia inoculata nel peritoneo con due dosi minime sicuramente letali, e ha ritardato di circa 4 giorni la morte in un'altra cavia (s'intende che così in questo, come negli altri simili esperimenti, non sono mai tralasciati i controlli contemporanei).

Vediamo ora come si comporta il latte.

Potere battericida del latte. — Il latte raccolto prima della immunizzazione non è stato capace di neutralizzare nella quantità di 5 cmc. neppure una d. m. l. per inoculazione nel peritoneo; per contrario, di tre cavie inoculate nel peritoneo con uguale quantità di latte raccolto dopo l'immunizzazione, mescolata con due DML, due sono morte ed una si è salvata; di due cavie similmente inoculate sotto cute se ne è salvata una. Il potere battericida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, del siero di sangue del capretto, raccolto prima della immunizzazione della madre, ha mostrato lo stesso comportamento del siero materno, ma tale potere battericida non si è *dimostrato gran che cresciuto* dopo la immunizzazione della madre.

Gli anticorpi battericidi dunque si sono comportati presso a poco come le agglutinine. Una quantità di queste sostanze passa nel latte, ma questo non riesce sempre e con sicurezza a salvare delle cavie, nelle quali contemporaneamente si inoculano due dosi letali

per iniezione intraperitoneale o sottocutanea; *a fortiori* ciò si può ripetere pel potere battericida acquistato dal capretto col succhiamento.

2. Capra.

Proveniente da Terracina, con capretto di 15 giorni.

Fu immunizzata col *B. coli dysentericum Celli.* Il *B. coli dysentericum* adoperato è quello che fu isolato dal Celli nel 1895 in Egitto, e che è stato conservato nell'Istituto mediante svariati passaggi in vari terreni di coltura, o in vari animali da esperimento. Per esaltare la virulenza di questo germe mi sono servito di tre serie di passaggi, l'una attraverso il corpo delle cavie, l'altra attraverso il corpo dei conigli, la terza attraverso il corpo dei gattini. La massima virulenza, che mi fu possibile di raggiungere, corrisponde a mezza patina per inoculazione intraperitoneale e ad una patina per inoculazione sottocutanea in cavie del peso medio di 230-280 gr. (*dose minima sicuramente letale*).

Col germe in tal modo esaltato furono fatte e la immunizzazione della capra e tutte le esperienze occorrenti per saggiare i vari poteri specifici.

Nelle osservazioni seguenti mancano le indicazioni relative al capretto, essendo questo disgraziatamente morto poco dopo arrivato all'Istituto.

Potere agglutinante del siero della capra. — Dando uno sguardo al potere agglutinante del siero di sangue, prima e dopo la immunizzazione, il titolo limite è cresciuto da 1:20 a 1:4000 (corrispondente ad una quantità di siero 0.00025 in 1 cmc.), quindi in misura presso a poco uguale a quella della capra 1, immunizzata col *B. coli;* ma vi è una differenza per ciò che riguarda il passaggio delle agglutinine nel latte.

Potere agglutinante del latte. — Infatti il titolo agglutinante del latte, che prima della immunizzazione era 0, dopo la immunizzazione è diventato 1:200 (corrispondente ad una quantità di siero uguale a cmc. 0.005 in 1 cmc.); quindi il rapporto quantitativo tra le agglutinine del latte e quello del siero è di $\frac{0.00025}{0.005} = 1:20$.

Potere battericida del siero della capra. — Il potere battericida *in vitro* del siero di sangue della capra, appena dimostrabile prima della immunizzazione, è nettamente ma non intensamente cresciuto dopo l'immunizzazione: tale accrescimento però è più notevole di quello osservato nel siero della capra 1; ed anche la dimostrazione del potere battericida *in vivo* è riuscita più confortante, in quanto che cmc. 0.1 di siero è bastato a salvare due cavie inoculate ognuna con due dosi sicuramente letali.

Potere battericida del latte. — Il potere battericida del latte *in vitro* è stato nullo tanto prima quanto dopo l'immunizzazione. *In vivo* in-

vece si è dimostrato abbastanza netto dopo l'immunizzazione, mentre prima della immunizzazione era assolutamente nullo. Infatti mentre tutte le cavie inoculate con una dose sicuramente letale mescolata con 5 cmc. di latte, preso prima della immunizzazione, sono morte rapidamente coi sintomi e le lesioni anatomiche caratteristiche della infezione, delle 6 inoculate con 2 D M L, aggiunte a 5 cmc. di latte preso dopo la immunizzazione, ne sono sopravissute 3, ed 1 è morta soltanto dopo 8 giorni. Delle 2 morte entro 48 ore, una presentò il reperto anatomico e batteriologico dell'edema maligno, e dall'altra non riuscì di dimostrare i germi inoculati nè colturalmente, nè microscopicamente: diremo più tardi la verosimile interpretazione di questo fatto.

Questi risultati senza dubbio sono migliori di quelli ottenuti dalla capra 1, ma non hanno disgraziatamente potuto avere il necessario complemento dell' esame del potere immunizzante del siero di sangue del capretto, essendo, come già si disse, morto pochi giorni dopo arrivato nell' Istituto.

Questa seconda serie di esperienze dimostra ancor meglio della prima il passaggio delle agglutinine e degli anticorpi battericidi nel latte, sebbene in misura non troppo forte, ma non permette di concludere nulla riguardo al loro passaggio attraverso la mucosa gastrenterica del poppante.

3. Capra.

Proveniente da Terracina, con capretto di 10 giorni.

Fu immunizzata con tre differenti *Batteri disenterici* [Celli, Kruse, Flexner (Manila)]. Il B. del Kruse proviene dal laboratorio di Král, quello del Flexner (Manila) fu 3 anni fa cortesemente fornito all'Istituto dall'autore stesso. Per esaltare la virulenza del *B. Kruse*, mi sono servito di passaggi attraverso il corpo di parecchie cavie; per esaltare quella del *B. Flexner* (Manila) ho fatto 2 serie di passaggi, l'una attraverso il corpo di conigli, l'altra attraverso il corpo di cavie. Anche per questi germi non mi è riuscito di esaltare la virulenza ad un grado superiore a quello già detto per il *B. coli* e per il *B. Celli*; anche per questi due la dose sicuramente letale era rappresentata da mezza patina per inoculazioni nel peritoneo e da una patina per inoculazione sotto cute in cavie di un peso medio di 250 gr. I germi così esaltati furono adoperati e per immunizzare la capra e per le ricerche annesse.

I poteri specifici acquistati da questa capra in seguito all'immunizzazione con i 3 stipiti dissenterici, quantunque le inoculazioni siano state fatte sempre con eguale quantità di materiale batterico, con intervalli di tempo ed in condizioni presso a poco eguali, si

sono tuttavia dimostrati differenti per ragioni che è ovvio immaginare.

Esaminiamo, come al solito, prima il potere agglutinante e poi il potere battericida.

Potere agglutinante del siero della capra. — Il limite del potere agglutinante sul *B. Celli* è cresciuto nel siero di sangue della capra da 1: 20 ad 1: 4000, di un multiplo uguale a quello riscontrato nella capra 2, immunizzata col solo *B. Celli.* Sul *B. Kruse* invece il potere agglutinante è cresciuto da 1: 20 ad 1: 1000, vale a dire è diventato soltanto 50 volte più forte.

Sul *B. Flexner* (Manila) il siero prima della immunizzazione non aveva alcun potere battericida; dopo la immunizzazione invece questo ha acquistato un titolo limite di circa 1: 800.

Potere agglutinante del latte. — Nel latte il titolo agglutinante sul *B. Celli* da 0, prima dell'immunizzazione, è salito a 1: 100 dopo la immunizzazione; quindi il rapporto quantitativo tra le agglutinine del latte e quelle del siero è di $\frac{1}{400} : \frac{1}{100} = 1 : 40$.

Per il *B. Kruse*, il titolo agglutinante nel latte è salito a circa 1: 100; dunque le agglutinine passate nel latte stanno a quelle presenti nel siero come 1: 10.

Il titolo agglutinante sul *B. Flexner* (Manila), nullo prima dell'immunizzazione del latte, come nel siero di sangue, è divenuto dopo la immunizzazione quasi eguale ad 1: 80. Questo titolo, paragonato con quello del siero, prova che anche per il *B. Flexner* (Manila) il latte, a pari volume, contiene circa 1/10 delle agglutinine presenti nel siero.

Potere agglutinante del siero del capretto. — Nel capretto il siero di sangue, prima della immunizzazione della madre, aveva un potere agglutinante nullo per il *B. Flexner* (Manila), uguale a 1: 10 per gli altri due stipiti. Finito il periodo di immunizzazione, il titolo agglutinante per il *B. Celli* è diventato 1: 200, per il *B. Kruse* 1: 150, per il *Flexner* (Manila) appena 1: 40.

Paragonando i tre titoli agglutinanti del siero del capretto con i tre corrispondenti del latte della madre, appare evidente che le agglutinine presenti nel latte passano abbondantemente attraverso la mucosa gastrenterica del poppante, e si rendono dimostrabili nel siero del suo sangue.

Potere battericida del siero della capra. — Esaminiamo ora il comportamento del potere battericida *in vitro*. Mentre prima dell'immunizzazione il siero di sangue possedeva una leggerissima azione battericida, presso a poco uguale per tutti e tre i germi, dopo la

immunizzazione l'azione battericida è cresciuta in egual misura per il *B. Kruse* ed il *B. Flexner* (Manila), ed in misura di poco maggiore per il *B. Celli.*

La dimostrazione del potere battericida del siero di sangue *in vivo* non è riuscita gran fatto migliore. Le cavie, inoculate nel peritoneo con 2 D M L e cmc. 0.1 di siero, non si sono infatti salvate (sono morte con ritardo da 3 a 12 giorni rispetto ai controlli); e di due cavie inoculate con uguale quantità di siero e due D M L di *B. Celli*, soltanto una è sopravvissuta, mentre l'altra è morta con ritardo di 7 giorni sul controllo.

Potere battericida del latte. — Il potere battericida del latte *in vitro,* nullo prima della immunizzazione, non si è potuto determinare dopo la immunizzazione, a causa dell'invasione di colonie di *protei.*

In vivo l'azione battericida del latte si è dimostrata mediocre per il *B. Celli*, minima per gli altri due stipiti; maggiore quando la inoculazione si è fatta sotto cute, anzichè nel peritoneo.

Potere battericida del siero del capretto. — Il potere battericida del siero di sangue del capretto, allattato dalla capra 3, sui tre stipiti ha presentato *in vitro* prima della immunizzazione lo stesso comportamento del siero materno, e dopo l'immunizzazione è poco o punto aumentato.

In vivo invece la detta azione, pur essendo piccola, non si può disconoscere rispetto al *B. Celli.*

Da questa terza serie di esperienze, risulta che mentre nel latte è passata una buona quantità di agglutinine per ciascuno dei tre germi, e mentre le agglutinine esistenti nel latte sono passate abbondantemente nell'organismo del poppante, le sostanze battericide al contrario sono passate in troppo scarsa misura nel latte ed *a fortiori* nell'organismo del capretto.

4. Capra.

Proveniente da Poggio Moiano. Entrò nell'Istituto il 27 febbraio 1906: il 14 aprile partorì un capretto, che disgraziatamente morì poco dopo; per cui dovetti limitare le mie ricerche allo studio del passaggio degli anticorpi nel latte.

La capra fu immunizzata con due stipiti (3 e 4) di *B. coli,* isolati da feci diarroiche, dotati di una virulenza pari ad 1 ansa normale per 250 grammi di cavia: alle iniezioni reagì abbastanza vivamente.

I poteri agglutinante e battericida del siero e del latte furono, prima e dopo l'immunizzazione, saggiati sugli stipiti virulenti coi quali la capra era stata trattata, e sopra due altri stipiti di *B. coli* avirulenti (stip. 1 e 2).

Potere agglutinante del siero della capra. — Il potere agglutinante del siero normale, quasi nullo o nullo affatto per gli stipiti 1 e 2, raggiunge per gli stipiti 3 e 4 un rapporto di 1 : 10.

Dopo l'immunizzazione, il potere agglutinante del siero risulta notevole verso gli stipiti che sono stati adoperati per l'immunizzazione, piuttosto scarso invece verso i due altri stipiti avirulenti. Infatti raggiunge il rapporto di 1: 5000 per gli stipiti 3 e 4, mentre per gli stipiti 1 e 2 il titolo limite dell'agglutinazione è sola mente di 1 : 100. Osserviamo ancora come l'agglutinazione proceda lentamente per tutti gli stipiti e come nei rapporti o concentrazioni deboli essa sia dimostrabile solo alla sesta ora.

Ritenendo sempre a 6 ore il limite di tempo prescelto per confrontare i risultati, quali si possono osservare distintamente ad occhio nudo, si osserva, per gli stipiti che hanno servito all'immunizzazione della capra, che lo stesso effetto prodotto da 0.1 cmc. di siero normale si ottiene usando 0.0002 cmc. di siero immune; quindi il siero, dopo il trattamento della capra, ha aumentato il suo potere agglutinante di $\frac{0.1}{0.0002}$, ossia è divenuto 500 volte più forte. Invece sui *B. coli* avirulenti il potere agglutinante è scarsissimo, e anzi posso dire che in tal modo si comportò anche verso parecchi altri stipiti virulenti e avirulenti di *B. coli*, mentre si dimostrò dotato di un certo potere agglutinante solo verso pochi altri stipiti virulenti, isolati nelle stesse condizioni degli stipiti 3 e 4.

Potere agglutinante del latte. — Il potere agglutinante del latte normale, nullo per lo stipite 4, raggiunge solo il rapporto 1 : 4 per lo stipite 3; dopo l'immunizzazione invece il latte agglutina nel rapporto di 1 : 50 il *B. coli* 4 e nel rapporto 1 : 40 il *B. coli* 3; verso gli stipiti avirulenti non c'è affatto agglutinazione, nè prima nè dopo l'immunizzazione, per il *B. coli* 1, mentre per il *B. coli* 2 da un'agglutinazione di 1 : 2 prima dell'immunizzazione, si giunge al rapporto di 1 : 20 dopo l'immunizzazione: da notare che il siero della capra agglutina ambedue questi stipiti nel rapporto di 1 : 100.

Il rapporto fra la carica di agglutinine del latte e quella del siero dà cifre su per giù eguali per gli stipiti che hanno servito all'immunizzazione della capra; infatti abbiamo per il

$$B.\ coli\ 4 \quad \frac{1}{5000} : \frac{1}{40} = 1 : 125$$

$$B.\ coli\ 3 \quad \frac{1}{5000} : \frac{1}{50} = 1 : 100$$

Le agglutinine sono dunque passate nel latte della capra, ma in iscarsa quantità, come indica il rapporto fra la carica di agglutinine del latte e quella del siero.

Potere battericida in vitro *del siero.* — Rispetto al potere battericida saggiato *in vitro* vediamo come il siero normale determina soltanto, e non sempre, una leggera diminuzione, affatto trascurabile, di colonie rispetto al controllo: per il latte prima dell'immunizzazione non si osserva alcuna diminuzione, anzi bene spesso un aumento sul controllo. Invece dopo l'immunizzazione il siero di sangue verso gli stipiti 3 e 4 mostra un certo potere battericida, tale da ridurre il numero delle colonie per campo da 4 e 3.8 a poco più di 1-1.5 per uno stipite e a circa 3 per l'altro stipite.

Non esercita invece alcuna azione battericida verso i *B. coli* avirulenti; solo per uno stipite si osserva una leggera diminuzione nel numero delle colonie, non più forte però di quella che si ha per azione di siero normale. Conseguentemente verso questi stipiti avirulenti anche il latte dopo l'immunizzazione non mostra alcuna azione battericida.

Potere battericida in vitro *del latte.* — Il latte dopo l'immunizzazione ha esercitato una leggera azione battericida verso gli stipiti 3 e 4, così leggera però da non potersi con sicurezza determinare.

Sicchè le esperienze *in vitro* non ci permettono sicuramente di affermare che sia passata nel latte almeno una parte di quelle sostanze immunizzanti, che pure l'esperienza *in vitro* ci permette di riconoscere presenti nel siero di sangue.

Ma le ricerche eseguite *in vivo* ci possono lasciar sospettare che questa mancata azione sia dovuta non già all'assenza di sostanze immunizzanti, bensì alla scarsezza o mancanza di complementi.

Potere battericida in vivo *del siero.* — Il siero, che non ebbe alcuna azione battericida prima dell'immunizzazione salvò le cavie inoculate con 3 DML dello stipite 3 nelle dosi di 0.5, 0.005 e 0.001, mentre si dimostrò inattivo in dosi di 0.1 e 0.01: salvò le cavie inoculate con 10 DML dello stipite 4 nella dose di 0.005 e quelle inoculate con 5 DML nelle dose di 0.01, mentre in dosi superiori ed inferiori non dimostrò alcun potere battericida, riuscendo solo a ritardare di qualche ora la morte. Si ebbe cioè il fenomeno paradossale, che prende il nome da Neisser e Wechsberg.

Potere battericida in vivo *del latte.* — Infatti 4 cmc. di latte, inoculati nel peritoneo di cavie insieme con 3 DML dello stipite 3 salvarono gli animali dopo un periodo di abbattimento e di prostrazione durato circa 24 ore, mentre il corrispondente controllo soccombeva in 7 ore. Non così evidenti però sono i risultati ottenuti con lo stipite 4, del quale però inoculai un maggior numero di DML. Ma rispetto al controllo, morto in 6 ore, si ebbe un ritardo nella

morte, di 2 e di 3 giorni, e nòn è da escludere che se mi fosse stato possibile di replicare le esperienze, diminuendo la quantità dei germi, probabilmente avrei ottenuto anche per lo stipite 4 gli stessi buoni risultati avuti per lo stipite 3.

È indubitato dunque che *le sostanze immunizzanti contenute nel siero sono pure passate nel latte*: questa conclusione è confortata specialmente dai risultati ottenuti verso lo stipite 3, per il quale pure è dimostrabile una leggera azione battericida *in vitro*.

Rileviamo ancora come il siero e il latte di questa capra, immunizzata con gli stipiti virulenti, abbiano *azione agglutinante molto limitata verso gli stipiti avirulenti e nessun'azione batterica sia dimostrabile* in vitro *verso gli stessi.*

5. Capra.

Proveniente da Assisi, con un capretto lattante.

Fu pochi giorni dopo la sua entrata nell'Istituto sottoposta a inoculazioni con due stipiti di *B. coli* avilurenti (1 e 2), alle quali si ebbe forte reazione locale, senza però alterazioni nello stato generale, salvo un aumento lieve di temperatura di breve durata, dopo ogni iniezione; anche il capretto stette sempre bene. Lo scopo delle nostre ricerche era quello di vedere se immunizzando con germi avirulenti fosse possibile ottenere anticorpi verso stipiti virulenti, e se questi anticorpi potessero passare nel latte e successivamente attraverso la mucosa gastrenterica del poppante; cinque giorni dopo l'ultima inoculazione procedemmo a queste ricerche.

Gli stipiti (3 e 4) di *B. coli* virulenti furono gli stessi che servirono all'immunizzazione della capra 4.

Potere agglutinante del siero della capra. — Il potere agglutinante del siero della capra prima dell'immunizzazione era nullo per lo stipite 1, aveva un titolo di 1 : 25 per lo stipite 2 e di 1 : 10 e 1 : 5 rispettivamente per gli stipiti 3 e 4. Dopo l'immunizzazione il siero stesso perde ogni potere agglutinante anche nei più forti rapporti verso lo stipite 3, mentre per il *B. coli* 4 si ottiene agglutinazione netta sino al rapporto 1 : 100. Il potere agglutinante si comporta dunque verso gli stipiti che non furono adoperati per l'immunizzazione precisamente come nella capra 1, come se le agglutinine fossero specifiche per ogni singolo stipite di *B. coli*. Verso gli stipiti, che hanno servito al trattamento della capra, il siero di sangue arriva al titolo di 1 : 1000 per il *B. coli* 1 e al titolo di 1 : 8000 per il *B. coli* 2. Per lo stipite 1 l'effetto prodotto da cmc. 0. 1 di siero prima dell'immunizzazione è eguale a quello prodotto da cmc. 0. 001 dopo l'immunizzazione, ossia il potere agglutinante è divenuto $\frac{0.1}{0.001}$ ossia 100 volte più forte. Per lo stipite 2 l'effetto prodotto da 0. 2

di siero prima dell'immunizzazione è uguale a quello prodotto da 0. 000125 dopo l'immunizzazione, ossia il potere agglutinante è divenuto $\frac{0.2}{0.000125}$, cioè 1600 volte più forte.

Potere agglutinante del latte. — Il potere agglutinante del latte, assolutamente nullo per tutti gli stipiti prima dell'immunizzazione, rimane dopo l'immunizzazione pure nullo per lo stipite 3, comportandosi come il siero, e raggiunge solamente il titolo 1.: 10 per lo stipite 4; il latte dopo l'immunizzazione agglutina nel rapporto 1 : 80 lo stipite 1 e nel rapporto 1 : 300 lo stipite 2; confrontando la carica del siero con quella del latte abbiamo:

per lo stipite 1 $\frac{1}{1000} : \frac{1}{80} = 1 : 12$

id. 2 $\frac{1}{8000} : \frac{1}{300} = 1 : 26$

id. 4 $\frac{1}{100} : \frac{1}{10} = 1 : 10$

Non solo dunque le agglutinine sono passate nel latte, ma vi sono anche passate in quantità notevole, come si vede dai rapporti su esposti.

Potere agglutinante del siero del capretto. — Vediamo ora se è avvenuto il passaggio delle agglutinine attraverso la mucosa gastrenterica del capretto poppante; il siero normale del capretto non ha alcuna azione agglutinante sugli stipiti 1 e 2, ha azione debole sugli stipiti 3 e 4; dopo l'immunizzazione della madre, il potere agglutinante verso gli stipiti 3 e 4 diminuisce, mentre verso lo stipite 1 raggiunge il titolo di 1 : 50 e verso lo stipite 2 di 1 : 100. *Le agglutinine, dunque, contenute nel latte sono passate attraverso la mucosa gastrenterica del capretto,* in notevole quantità, e facendo i rapporti fra la carica del latte e quella del siero del capretto otteniamo 1 : 1.6 per lo stipite 1, e 1 : 3 per lo stipite 2.

A differenza delle agglutinine, aventi azione solo sui germi che hanno servito al trattamento della capra, *le sostanze immunizzanti ottenute per inoculazione di stipiti avirulenti hanno azione anche sugli stipiti virulenti:* questi risultati non si possono confrontare con quelli ottenuti nella capra 4 trattata con stipiti virulenti, nella quale *in vitro* il siero ed il latte erano sprovvisti di azione battericida verso gli stipiti avirulenti.

Potere battericida in vitro *del siero della capra.* — Consideriamo da prima i risultati ottenuti *in vitro.* Il siero della capra prima dell'immunizzazione ha solo una leggerissima azione battericida quasi insignificante, mentre dopo l'immunizzazione dimostra un notevole potere battericida sopra quasi tutti gli stipiti, e sopra tutto

sopra i *B. coli* 1 e 2, per i quali la battericidia è completa con l'aggiunta di 1 e di 0.5 cmc. di siero, quasi insignificante con l'aggiunta di 0.1: verso lo stipite 3 si ha intensa battericidia nei rapporti 1: 1 e 1 : 2, e una diminuzione abbastanza forte nel rapporto 1 : 10; non così intensa, ma netta è la diminuzione di colonie che si ha per lo stipite 4.

Potere battericida in vitro *del latte.* — Il latte prima dell'immunizzazione non ha alcun potere battericida, anzi si comporta come buon terreno nutritivo: dopo l'immunizzazione acquista un discreto potere battericida, specialmente rispetto al *B. coli* 2; anche per gli stipiti 3 e 4 si osserva una diminuzione nel numero delle colonie rispetto al controllo, su per giù nei rapporti 1 : 4 e 1: 2 rispettivamente.

Potere battericida in vitro *del siero del capretto.* — Il siero del capretto, che prima dell'immunizzazione della madre non ha alcuna azione battericida, neppure dopo l'immunizzazione della madre dimostra di averne acquistata, almeno in tal misura da lasciar supporre un passaggio di sostanze immunizzanti dalla madre al figlio; e alla diminuzione di colonie osservata per lo stipite 2 non oso dare troppa importanza dato il comportamento dello stesso siero verso altri stipiti. Le esperienze eseguite *in vitro* ci permettono dunque solo di affermare il *passaggio di sostanze immunizzanti nel latte che però non sono dimostrabili nel siero del capretto lattante.*

Potere battericida in vivo *del siero della capra.* — Le esperienze fatte *in vivo* con gli stipiti virulenti non diedero il bel risultato, che era lecito prevedere dopo quello ottenuto *in vitro*: ciò dipende sicuramente dal fatto che il numero di DML inoculate era eccessivo. Ma verso il *B. coli* 4 vediamo ripetersi lo stesso fatto osservato per il siero della capra 1, vediamo cioè salvarsi solo la cavia trattata con 0.1 cmc. di siero, mentre quelle trattate con dosi superiori ed inferiori morirono tutte.

Potere battericida in vivo *del latte.* — Il latte non si comportò meglio del siero verso la stessa quantità di DML e solo determinò un ritardo nella morte rispetto al controllo; ma diminuendo ad una il numero delle DML, mentre i rispettivi controlli muoiono in poche ore, le cavie inoculate con 4 cmc. di latte sopravvivono tutte, dopo un breve periodo di abbattimento.

Potere battericida in vivo *del siero del capretto.* — Il siero del capretto *in vivo* non dimostra alcuna azione battericida. Risulta quindi dalle esperienze *in vivo* che nel latte sono passate delle sostanze immunizzanti, in copia tale però, che possono avere azione sola-

mente quando la dose di germi inoculata non è eccessiva: *ma anche dopo questa ricerca non è possibile asserire il passaggio di anticorpi battericidi nel siero del capretto.*

6. Capra.

Proveniente dalla campagna romana.

Entrò nell'Istituto il 17 marzo di quest'anno, ma non fu potuta utilizzare per la immunizzazione in quanto che non era gravida, nè mai diede secrezione lattea; pensai quindi, per quanto avesse l'età di circa 18 mesi, di studiare su di essa l'eventuale passaggio di anticorpi attraverso l'intestino, facendole ingerire quotidianamente per circa un mese una quantità media di 200 cmc. di latte raccolto dalla capra 4 durante l'ultimo periodo della immunizzazione.

Potere agglutinante del siero. — Il siero di sangue della capra 6, prima dell'ingestione non agglutinava in alcun rapporto gti stipiti di *B. coli* 1, 3 e 4 e solo nel rapporto 1 : 5 lo stipite 2: dopo la ingestione invece lo stesso siero agglutina nel rapporto di 1 : 100 gli stipiti 3 e 4 e agglutina anche sino al rapporto 1 : 50 gli stipiti 1 e 2.

Potere battericida in vitro *e* in vivo *del siero.* — Lo stesso siero non dimostrò nè *in vitro*, nè *in vivo* alcuna azione battericida; onde possiamo concludere che in questo caso *sono passate attraverso la mucosa gastrenterica solo le agglutinine.*

Confrontando la carica del siero della capra 4 con quella del siero della capra 6, abbiamo per i due stipiti virulenti il rapporto seguente:

$$\frac{1}{5000} : \frac{1}{100} = 1 : 50$$

Sembra strano che per la ingestione del latte, nel quale abbiamo visto i rapporti limiti di agglutinazione elevarsi solo a 1 : 40 e 1 : 50 si riscontri nel siero della capra 6 una carica maggiore che nel latte stesso; vedremo più oltre la probabile spiegazione di questo fatto.

7. Vacca « Perla ».

Della vaccheria Serafini in via Viminale.

Per la immunizzazione della vacca furono adoperati tre stipiti di *B. coli commune*, isolati dalle feci di bambini diarroici.

La virulenza di questi stipiti era, subito dopo l'isolamento, tale che occorrevano 3 anse normali di fresca agarcoltura, per inoculazione intraperitoneale, per uccidere in 24 ore una cavia del peso di circa 250 gr. Furono tutti e tre esaltati, prima mediante semplici passaggi per il corpo della cavia, e poi col metodo delle aggressine. Si potè così conferire a tutti e tre gli

stipiti una virulenza 30 volte maggiore, sicchè la DML era in fine rappresentata da $^{1}/_{10}$ di ansa normale.

Le inoculazioni furono fatte sotto la cute delle natiche o delle spalle. Si inocularono sempre le patine dei 3 stipiti, precedentemente stemperate in soluzione di NaCl e mescolate. Si cominciò con ⅓ di patina per ciascuno stipite, riscaldata prima a 70° C. per 2 ore, poi a 65 per 1 ora, poi a 60 per ½ ora, e finalmente di 6 patine senza alcun trattamento preliminare, con intervalli di circa una settimana.

La reazione locale, consistente in una tumefazione edematosa in corrispondenza del punto d'inoculazione, fu leggiera in principio; ma quando si cominciò ad inoculare le colture vive, divenne molto più intensa, compartecipando al processo anche l'apparecchio linfatico; per modo che le iniezioni furono interrotte per circa 20 giorni. Insieme colla più intensa reazione locale fu osservato anche elevazione della temperatura (39,3-40,5) e uno stato di abbattimento generale.

Le inoculazioni furono riprese, cominciando però di nuovo con colture riscaldate per ½-1 ora a 55° C., per ritornare subito alla inoculazione di 3 patine di batteri vivi. Furono fatte in tutto 15 inoculazioni, 7 prima del periodo d'interruzione. che ho detto, e 8 dopo. Il processo d'immunizzazione è durato in tutto poco più di 3 mesi.

Le ricerche dei poteri specifici furono fatte in parecchi intervalli.

Prima dell'immunizzazione il siero di sangue e il latte della vacca non avevano sui 3 stipiti di *B. coli* alcun potere agglutinante nè battericida, tanto *in vitro* quanto *in vivo.*

Dopo 17 giorni dal principio dell'immunizzazione (la vacca aveva già ricevuto tre inoculazioni), si è ripetuto il saggio del potere agglutinante del latte, con esito uguale a quello che si ebbe prima dell'immunizzazione.

Dopo altri 14 giorni il potere agglutinante del latte si mostrò nullo, come nelle altre prove già fatte.

Fu allora saggiato anche il potere battericida, ma soltanto *in vivo*; dò in questo specchietto il risultato delle esperienze:

Cavie	Peso in Gr.	Liquido inoculato nel peritoneo	Esito
N. 1..	280	1 ansa normale di agarcoltura di *B. coli n. 1*, stemperata in 3 cmc. di brodo.	† in 48 ore. Setticemia da *B. coli*.
» 2..	250	1 ansa normale di agarcoltura di *B. coli n. 1*, stemperata in 3 cmc. di latte.	Si salva.
» 3..	240	1 ansa normale di agarcoltura di *B. coli n. 2*, stemperata in 3 cmc. di brodo.	† dentro le 48 ore. Setticemia di *B. coli*.
» 4..	270	1 ansa normale di agarcoltura di *B. coli n. 2*, stemperata in 3 cmc. di latte.	Si salva.
» 5..	260	1 ansa normale di agarcoltura di *B. coli n. 3*, stemperata in 3 cmc. di brodo.	† Dentro le 48 ore. Setticemia di *B. coli*.
» 6..	250	1 ansa normale di agarcoltura di *B. coli n. 3*, stemperata in 3 cmc. di latte.	† Id.
» 7..	250	3 cmc. di latte.	Si salva.

Da questo specchietto si vede che nel latte della vacca immunizzata sono passati degli anticorpi battericidi, almeno rispetto agli stipiti n. 1 e n. 2.

Dopo altri 15 giorni i saggi dei poteri specifici furono ripetuti non solo col latte, ma anche col siero di sangue.

Per ciò che riguarda il potere agglutinante del siero di sangue, il rapporto più debole nel quale il fenomeno fu osservato dopo sei ore fu:

$A_6 = 1:650$ per il *B. coli* n. 1
$A_6 = 1:600$ » » 2
$A_6 = 1:60$ » » 3

Nel latte invece non si ebbe alcuna azione agglutinante su nessuno dei tre stipiti.

Il potere battericida del siero del sangue fu saggiato soltanto *in vivo*.

Cavie	Peso in Gr.	Materiale inoculato (riportato prima a 3 cmc. con brodo sterile)	Esito
N. 1..	310	3DML *B. coli 1*	† in 12 ore. Setticemia da *B. coli.*
» 2..	290	» » + 0.03 di siero . . .	Si salva.
» 3..	300	» » + 0.1 di siero . . .	Si salva.
» 4..	280	» *B. coli 2*	† in 12 ore.
» 5..	220	» » + 0.03 di siero . . .	† in 16 ore.
» 6..	310	» » + 0.1 di siero . . .	† in 12 ore.
» 7..	310	» *B. coli 3*	† in 12 ore.
» 8..	250	» » + 0.03 di siero . . .	Si salva.
» 9..	260	» » + 0.1 di siero . . .	† in 12 ore.

Il siero di sangue della vacca dunque dimostra un certo potere battericida, specialmente sul *B. coli* 1 e in parte anche sul *B. coli* 3; mentre appare senza alcuna azione sul *B. coli* 2.

Per ciò che riguarda il *B. coli* 3 è da notare che si è salvata la cavia inoculata con minor quantità di siero ed è perita quella inoculata con dose più forte. Questo fatto si è ripetuto in altre esperienze di simil genere, e non è un semplice caso.

Il saggio del potere battericida del latte, ripetuto nella stessa maniera indicata a pag. 548, ebbe esito ancor meno favorevole, non essendosi avuto altro che un semplice ritardo nella morte delle cavie inoculate con virus e latte, rispetto a quelle di controllo.

La vacca « Perla » dunque si è dimostrata molto più torpida delle capre nella produzione di sostanze immunizzanti verso il *B. coli*, giacchè nel siero di sangue non si è potuta riscontrare una buona quantità di anticorpi battericidi. Di questo torpore si ha un indice anche nel debole titolo agglutinante del siero. V'è da notare che il latte ha dimostrato un potere immunizzante più debole verso la fine che verso la metà del periodo d'immunizzazione: ciò sta d'accordo con quanto per altri batteri e per altri animali è stato osservato da altri autori, che cioè gli anticorpi in genere, raggiunto un certo massimo, scemano poi di nuovo nel progresso dell'immunizzazione.

È notevole ancora che nel latte della vacca non si sono mai riscontrate agglutinine.

III. Considerazioni.

1. Agglutinine.

1. *Indipendenza delle agglutinine e delle sostanze battericide.* — Dalla esposizione dei fatti sperimentali risulta che realmente gli anticorpi, intesi nel senso generale della paròla, passano nel latte e con questo possono anche passare attraverso la mucosa gastrenterica dei poppanti. Però dobbiamo subito far distinzione fra agglutinine che passano non solo nel latte, ma anche nel siero dei lattanti, ed anticorpi battericidi, che nel siero dei poppanti non sono dimostrabili. Non posso convenire, almeno per ciò che riguarda gli anticorpi pel il *B. coli* e per i *Bb. dissenterici*, con quelli che credono esistere un certo rapporto tra le une e gli altri: basti rammentare le esperienze fatte col siero di sangue e col latte della capra 3, il cui potere agglutinante si è dimostrato abbastanza forte mentre il potere battericida è stato molto debole. Quindi il passaggio delle agglutinine non è criterio per sè sufficiente a fare ammettere senz'altro anche il passaggio delle sostanze battericide.

Dalle mie esperienze, come da quelle di altri autori su argomenti affini, appare dunque che il potere agglutinante è privo di quella grande importanza che altri sembra attribuirgli, e non ne farei ulteriormente menzione, se non fosse per accennare a qualche fatto degno di nota.

Fenomeno paradosso nel latte. — L'agglutinazione sul *B. Celli*, prodotta dal latte della capra 2, dopo due ore fu nettissima nei rapporti di 1:40 - 1:100, mancante nei rapporti più alti e più bassi: dopo 6 ore divenne nettissima anche nel rapporto di 1:20 e appena percettibile nel rapporto di 1:10, mentre rimase costantemente negativa nei rapporti di 1:2-1:5.

Questo comportamento singolare, denominato *fenomeno paradosso*, già da vari autori artificialmente provocato nei sieri agglutinanti di animali immunizzati, poi studiato negli stessi sieri invecchiati, fu da me per primo osservato anche nei sieri freschi dei tifosi, acquistando così una importanza pratica per la sierodiagnosi. La presente osservazione dimostra che *il fenomeno paradosso si può osservare anche nel latte freschissimo degli animali immunizzati.*

Specificità delle agglutinine per vari stipiti di B. coli. — La formazione di agglutinine, provocata dal *B. coli,* si ottenne con gli stipiti da noi adoperati, tanto virulenti quanto avirulenti, nessuna influenza

avendo in ciò il potere patogeno. Queste agglutinine sembrano essere specifiche per quegli stipiti di *B. coli* che sono stati adoperati nella immunizzazione; l'organismo, cioè, reagisce solamente con anticorpi aventi affinità per quei dati stipiti, siano essi virulenti o avirulenti, mentre verso altri stipiti l'azione agglutinante può mancare od essere così debole, da potersi ascrivere a reazioni di gruppo. Questo fatto è stato osservato da parecchi degli autori che si sono occupati della agglutinazione del *B. coli* (Jatta (13) Sidney Wolf (21), Di Donna (7), Park ed altri) (18).

Passaggio delle agglutinine attraverso la mucosa intestinale di animali adulti. — Un altro fatto notevole, che risulta dalle mie esperienze, è la possibilità del passaggio degli anticorpi, limitatamente però a quelli agglutinanti, attraverso la mucosa gastrenterica non solo dei lattanti, ma anche degli adulti, come dimostrano le osservazioni fatte sulla capra 6, dell'età di circa 18 mesi.

È noto che il passaggio degli anticorpi fu dimostrato da vari autori possibile nei lattanti e spiegato per le particolari condizioni di struttura e di funzionalità del loro canale digerente; infatti, secondo il Behring, l'assorbimento delle sostanze proteiche si farebbe durante i primi periodi di vita in modo molto facile, e, in conseguenza, gli anticorpi, a tali sostanze legati, potrebbero passare dall'intestino del lattante in circolo, tanto più che il Disse (8) dimostrò nell'epitelio assorbente dell' intestino dei lattanti una scontinuità anatomica dell'epitelio, che scompare poi nell'adulto; inoltre è noto come nei lattanti sia scarsa la secrezione acida e peptica della mucosa gastrica. La possibilità del passaggio di anticorpi attraverso la mucosa gastrenterica di animali adulti e di ragazzi è stata dimostrata, che io sappia, solamente dal Figari (10 e 11) per le agglutinine e le antitossine tubercolari. Le agglutinine sono passate anche attraverso la mucosa gastrenterica della nostra capra, già nel diciottesimo mese di vita, e, probabilmente, conforme all'idea del Salge (17) l'assorbimento da parte del tubo digerente deve essere stato agevolato dal provenire il latte, nel quale gli anticorpi erano contenuti, da un animale della stessa specie.

Sproporzione fra il titolo agglutinante del latte e quello del siero dell'animale alimentato con esso. — Ma dalle esperienze risulta anche un fatto a prima vista assurdo. Nel siero della stessa capra 6 si riscontra una carica di agglutinine maggiore che nel latte ingerito dall'animale. Infatti, mentre nel latte i rapporti limiti di agglutinazione si elevavano, per gli stipiti virulenti con cui fu trattata la capra lattifera, solo a 1 : 40 e 1 : 50, nel siero della capra 6, per tutti e

due gli stipiti, si ebbe agglutinazione nel rapporto di 1 : 100. Questo fatto trova spiegazione nella possibilità che il potere agglutinante del latte abbia avuto un titolo, che, essendo maggiore dopo le prime inoculazioni, sia andato via via scemando col progredire della immunizzazione. Ciò è confermato dal modo di comportarsi del potere agglutinante del latte della capra 1, che raggiunse il rapporto 1:100 dopo la quarta inoculazione, per scendere a circa 1:20 alla fine dell'immunizzazione.

Comportamento delle agglutinine, provocate dalla inoculazione di stipiti virulenti, rispetto a stipiti avirulenti. — È da notare inoltre che mentre il latte della capra 4ª, trattata con stipiti virulenti, agglutina lo stipite avirulento 2 nel rapporto limite di 1:20 e non agglutina affatto l'avirulento stipite 1, il siero della capra 6, che ha bevuto il latte della capra 4, agglutina i due stipiti avirulenti nel rapporto limite 1:50.

Due ipotesi possiamo formulare a spiegazione di questo fatto.

Potrebbe darsi che durante il periodo della immunizzazione, per un certo tempo, nel siero della capra 4, e conseguentemente nel latte, si trovasse una certa carica di agglutinine per i due stipiti di *B. coli* avirulenti, agglutinine che poi (secondo quel che ho già detto), col progredire della immunizzazione, sarebbero diminuite o scomparse e quindi non più dimostrabili nella ricerca eseguita al termine della immunizzazione. Ma può anche essere che un certo numero di agglutinine, passando attraverso il tubo gastrenterico, subisca delle modificazioni, per le quali, conforme all'ipotesi di Ehrlich, il loro gruppo aptoforo diventi adatto ai recettori agglutinabili di altri *B. coli.*

Comportamento delle agglutinine, provocate dalla inoculazione di stipiti avirulenti, rispetto a stipiti virulenti. — Infine facciamo rilevare il comportamento del siero della capra 5 e del suo capretto verso gli stipiti virulenti. Il siero della capra 5 e il siero del capretto, prima della immunizzazione, agglutinavano il *B. coli* 3 nel rapporto di 1:10; dopo la immunizzazione non si ebbe agglutinazione di sorta; così pure il siero del capretto agglutinava lo stipite 4 nel rapporto di 1:20, prima della immunizzazione, mentre dopo l'immunizzazione della madre, diede reazione agglutinante incerta nella concentrazione 1 : 10, nulla nella concentrazione 1 : 20: attesa però la debole differenza fra i rapporti prima e dopo la immunizzazione, è probabile si tratti di una semplice oscillazione fisiologica.

2. Sostanze battericide.

Veniamo ora al punto più importante della questione, vale a dire al potere battericida.

a) *Anticorpi battericidi nel siero.*

Influenza della virulenza degli stipiti sulla dimostrazione del potere battericida. — Abbiamo visto anzi tutto che *in vitro* il siero delle capre e dei capretti possiede già normalmente un leggerissimo potere battericida. Nel siero delle capre 1, 2 e 3 questo cresce, ma di poco, dopo la immunizzazione.

La scarsezza dell'azione battericida del siero *in vitro* potrebbe dipendere dalla mancanza o scarsezza di complementi, pure essendo presenti gran quantità di ambocettori (anticorpi s. str.); e tale ipotesi, ammettendo l'uguale costituzione delle sostanze battericide normali e di quelle che si producono *ex novo*, potrebbe valere per il siero saggiato tanto prima quanto dopo l'immunizzazione. Considerando però bene le esperienze fatte, la spiegazione è diversa per il siero prima della immunizzazione e per il siero dopo la immunizzazione. Nel primo caso la ragione non è la mancanza dei complementi o per lo meno non è soltanto essa, giacchè se così fosse le cavie inoculate nel peritoneo con una dose letale e con un centimetro cubo di siero si sarebbero dovute tutte quante salvare, il che non è avvenuto.

Per contrario il siero dopo l'immunizzazione, si dimostra scarsamente battericida *in vitro* per la scarsezza dei complementi; essendo gli ambocettori sicuramente presenti in abbondanza, come è provato dall'esito delle esperienze *in vivo*.

Il siero di queste capre, pure avendo acquistato notevole potere battericida, non ha però raggiunto quella forza immunizzante che sarebbe stato lecito di aspettarsi.

Influenza della virulenza degli stipiti sulla quantità degli anticorpi prodotti dall'animale inoculato. — Era già noto, ma recentemente è stato meglio dimostrato per il *vibrione del colera* dallo Strong (19), che la virulenza dei germi ha influenza sulla produzione dell'immunità attiva; ora siccome la virulenza, che ho potuto ridare ad alcuni dei germi adoperati nell'immunizzazione, ha raggiunto il valore di mezza patina, si può ammettere che adoperando stipiti più virulenti, si sarebbe ottenuto un effetto immunizzante maggiore; ma probabilmente non molto maggiore, giacchè dalle tabelle dello Strong risulta, per il *vibrione del colera*, che il potere immunizzante ottenuto con la inoculazione

di uno stipite virulento raggiunge nel caso più favorevole appena il doppio di quello che si può ottenere inoculando uno stipite avirulento. Non è questa dunque l'unica, nè forse la principale ragione. Probabilmente la forza immunizzante reale del siero è superiore a quella che risulta dalle esperienze *in vivo*. Gli anticorpi, prodotti dalle nostre capre, sono tutti o quasi tutti di natura battericida, non di natura antitossica. Ora quando si inocula nel peritoneo di una cavia la massa batterica rappresentata da un'intera agarcoltura insieme con una quantità di siero immune anche abbondante, i corpi batterici vengono certamente uccisi, ma tutto il materiale tossico risultante dal disfacimento di essi, essendo riassorbito, produce la morte dell'animale per intossicazione. Questa interpretazione, sviluppata in via generale dal Wolff, trova conferma nell'osservazione fatta in una delle cavie delle esperienze riguardanti la capra 2. Questa cavia inoculata nel peritoneo con cmc. 5 di latte immune e con una agarcoltura (2 dosi letali) di *B. Celli* morì in capo a 48 ore, ma non fu possibile di dimostrare la presenza del germe nè microscopicamente nè colturalmente, nè dal liquido peritoneale nè dalla milza nè dal sangue seminati in vari terreni, mentre ciò riuscì sempre negli animali di controllo. Molto probabilmente la morte di quella cavia non sarebbe avvenuta se la massa batterica corrispondente a due dosi letali, invece di essere rappresentata da una intera agarcoltura, fosse stata rappresentata, p. es., da 1-2-5 anse normali.

L'avere a disposizione uno stipite virulento costituisce, a mio vedere, una condizione preziosa, non tanto perchè permette di aumentare il potere immunizzante del siero, quanto perchè si può eliminare l'accennata causa di errore dalle esperienze che si fanno *in vivo* per saggiare il potere immunizzante del siero stesso; ciò spiega anche i più netti risultati ottenuti nelle successive esperienze usando stipiti di *B. coli* aventi una virulenza rappresentata da 1/10 di ansa normale.

Rapporti immunizzatorii fra stipiti virulenti e avirulenti. — Un appoggio alla giustezza del concetto testè svolto è fornito dalle capre 4 e 5.

Il potere battericida del siero delle capre 4 e 5, trattate con stipiti virulenti e avirulenti di *B. coli*, è invece dimostrabile sia *in vitro* che *in vivo;* dall'osservazione delle esperienze risulta che la capra inoculata con stipiti virulenti diede siero battericida solo per gli stipiti con cui fu trattata, e non per gli avirulenti; mentre la capra trattata con stipiti avirulenti diede siero battericida anche per gli stipiti virulenti.

Esiste dunque una differenza notevole fra produzione di agglutinine e di anticorpi battericidi; le prime sono specifiche solo per gli stipiti inoculati, mentre le sostanze battericide esercitano la loro azione anche su altri stipiti di *B. coli*. Anche questo fatto viene ad escludere la importanza che taluni AA. vogliono dare alla dimostrazione delle agglutinine come indice di immunizzazione. Dal lato pratico è importante il fatto che *stipiti avirulenti possono produrre un siero battericida verso germi virulenti.*

Il siero della capra trattata con stipiti avirulenti diede una battericidia *in vitro* molto più evidente del siero della capra 4. Si può riferire questa differenza alla quantità di sostanze battericide, ma migliore spiegazione, forse, si ha ammettendo nel siero della capra 7 una scarsezza di complementi, che sarebbero invece abbondanti nella capra 5. Infatti, il siero della capra 4, che *in vitro* diede risultati meno evidenti, *in vivo* si dimostrò dotato di un forte potere battericida, tale da salvare l'animale nella dose di 0.001 cmc. contro 3 DML; ciò è confermato anche dal modo di comportarsi del latte della capra 4, il quale si dimostrò battericida *in vivo*, mentre *in vitro* non si ottennero risultati evidenti, di certo per la scarsezza o mancanza di complementi in esso contenuti. Invece, per il latte della capra 5, data la maggior copia di complementi contenuti, anche *in vitro* si ottenne qualche buon risultato.

Fenomeno di Neisser e Wechsberg. — Importante è il modo di comportarsi del siero delle due capre 4 e 5 e della vacca Perla nelle esperienze eseguite *in vivo*. Come abbiamo veduto nella esposizione delle esperienze, si rese sempre manifesto il fenomeno che va sotto il nome di Neisser e Wechsberg, ossia le piccole quantità di siero come le grandi non riescono a salvare l'animale, mentre le dosi medie hanno un forte potere neutralizzante.

I primi a fare questa osservazione furono Löffler e Abel, e precisamente sperimentando sul *B. coli*; esperienze analoghe fece poi Pfeiffer col siero immune verso il *V. cholerae* e Leclainche e Morel per il mal rossino, il carbonchio sintomatico e l'edema maligno (15); infine di nuovo Löffler sul virus dell'afta epizootica. Questo fatto paradossale fu da Neisser e Wechsberg spiegato, secondo la teoria delle catene laterali di Ehrlich, mediante il così detto *storno dei complementi*. Perchè la battericidia avvenga non solo è necessaria la presenza delle sostanze immuni e dei complementi, ma occorre che essi si trovino in un certo rapporto; se la quantità delle sostanze immuni è eccessiva, si comprende come un buon numero di ambocettori rimarrà libero; ora il gruppo complementofilo degli ambocettori liberi può

avere verso il complemento un'affinità maggiore dello stesso gruppo degli ambocettori fissati; in questo caso sono gli ambocettori liberi che fissano i complementi, e rimane in tal modo impedita l'azione battericida delle sostanze immuni fissate ai recettori batterici, ma non attivate dai complementi. Questo ci spiega perchè le forti dosi di siero possono non essere battericide.

b) *Anticorpi battericidi nel latte.* — Anche gli anticorpi battericidi, come le agglutinine, passano nel latte, ma passano in minor quantità. Abbiamo visto che occorrono 5 cmc. di latte di capra immunizzata per salvare, e soltanto in alcuni casi, le cavie dalla inoculazione di 2 dosi letali. Il latte ha dunque un certo potere immunizzante, ma troppo debole. L'azione battericida dimostrata *in vitro* dal latte, tanto prima quanto dopo l'immunizzazione, è assolutamente nulla; ma siccome dopo l'immunizzazione il latte ha dimostrato un certo potere battericida *in vivo*, bisogna ammettere che una certa quantità di anticorpi battericidi per quanto piccola passa realmente nel latte; e quindi la mancanza assoluta del potere battericida *in vitro* del latte anche dopo l'immunizzazione dipende dalla mancanza di complementi. Dato lo scarso passaggio di anticorpi battericidi nel latte, si comprende che il potere battericida del siero del poppante debba essere minore o al più eguale a quello del latte.

Compariamo ora il potere battericida del latte della capra 2 immunizzata col solo *B. coli* e della capra 3 immunizzata, oltre che con questo, con altri 2 stipiti di *Bb. dissenterici*. Mentre le esperienze relative alla prima hanno quasi tutte avuto esito buono o almeno incoraggiante, le esperienze relative invece alla 2 non hanno avuto buon successo. Considerando che il latte della capra 1 rispetto a quello della 2 non rappresenta che un liquido immunizzante monovalente rispetto a un liquido polivalente, si potrebbe fino a un certo punto spiegare la differenza dei risultati accettando la spiegazione che è stata data per una simile differenza che si osserva tra l'azione dei sieri mono- e polivalenti.

Un siero monovalente è molto più efficace sul rispettivo germe che non un siero polivalente ottenuto con l'inoculazione dello stesso germe unito ad altri affini. Ma questa spiegazione non può bastare, giacchè abbiamo visto, almeno per le agglutinine, che esse sono in quantità presso a poco uguale tanto nel siero della capra 2 quanto nel siero della capra 3: certamente vi influiscono altri fattori che per ora a noi sfuggono completamente.

In conclusione dunque le mie esperienze dimostrano chiaramente

il passaggio degli anticorpi in genere nel latte, e quello delle agglutinine contenute nel latte attraverso la mucosa gastrenterica, mentre non riesce possibile nel siero dei poppanti dimostrare la presenza di sostanze battericide.

Nel poppante, almeno riguardo al gruppo dei germi intestinali studiati in questo Istituto, *non passano le sostanze immunizzanti introdotte col latte della madre fortemente immunizzata.* Facendo quest'affermazione non vogliamo generalizzare il fatto, ma solo trarre la conclusione nei limiti delle esperienze da noi eseguite. Infatti, la possibilità del passaggio degli anticorpi attraverso la mucosa gastrenterica dipende da varie circostanze: *dalla natura degli anticorpi, dal menstruo nel quale essi si trovano, dalla specie e dall'età dell'animale trattato, e dalla specie batterica adoperata per l'immunizzazione.*

Così abbiamo visto la facilità con cui passano le agglutinine; così vari AA. dimostrarono il passaggio dell'antitossina difterica e tetanica non solo nel latte ma anche nel sangue dei poppanti [Römer (14 e 16), Uffenheimer (20), Federici (9)], di emolisine e precipitine [Bertarelli (5), Bauer (1)]. Al menstruo dà importanza il Salge (18) il quale afferma che gli anticorpi attraversano inalterati la mucosa gastrenterica quando fanno parte integrante della secrezione mammaria dell' animale allattante, e non passano quando vengono somministrati sotto forma di siero. Inoltre ha importanza anche la specie di animale dal quale proviene il menstruo nel quale sono contenuti gli anticorpi: sembra, infatti, in alcuni casi necessario che, perchè avvenga il passaggio di sostanze antitossiche e battericide, il latte non provenga da un'altra specie animale (Salge). Anche la specie dell'animale su cui si esperimenta ha importanza; infatti Uffenheimer dimostrò che mentre il *B. prodigioso* e le albumine non passano nelle cavie, passano invece nei conigli.

È ovvio, poi, che se noi abbiamo ottenuto risultati negativi per il *B. coli* e se negativi furono i risultati per altri germi intestinali, non vuol dire che per altre specie batteriche non si possano avere risultati più favorevoli.

Lo scopo pratico delle nostre ricerche, ad ogni modo, è fallito, e non è possibile trasportare nel campo della terapia e profilassi infantile l'immunizzazione per mezzo del latte di animali fortemente immunizzati; *verso altre vie, dunque, si devono rivolgere gli sforzi alla ricerca di un mezzo di difesa contro le infezioni colibacillari.*

IV. Alcune esperienze di vaccinazione.

Dalle molteplici esperienze esposte appare dunque che il latte fornito da animali attivamente immunizzati, pur contenendo in generale degli anticorpi battericidi, non è adatto a conferire un notevole grado d'immunità, neppure dopo una somministrazione quotidiana lungamente protratta.

Eppure bisogna lottare energicamente contro le così dette enterocoliti, che uccidono annualmente in Italia diecine di migliaia di bambini.

Per ciò, seguendo il tenace volere del mio maestro, mi accinsi allo studio delle vaccinazioni, confortato dai buoni risultati già ottenuti su questa via contro la peste, ed anche contro il tifo.

Dirò brevemente per ora, riservando a più diffusa memoria i particolari.

Uno stipite di *B. coli commune*, della virulenza di $^1/_{10}$ di ansa normale, fu adoperato per immunizzare dei conigli: il siero di questi, dopo l'immunizzazione, aggiunto a del brodo, servì di terreno di coltura allo stesso *B. coli commune*: dopo 3 giorni di termostato fu portato per 2 ore alla temperatura di 60° C. Due cavie del peso medio di 250 gr. furono inoculate sotto cute con 4 cmc. di questo materiale. Dopo 8 giorni furono inoculate con 6 DML del *B. coli* nel peritoneo. Le 2 cavie si salvarono, laddove 2 controlli perirono in 12 ore.

Però la dose di 4 cmc. è enorme, e dovendola riferire a peso di animale, si sarebbero ottenuti dei valori inapplicabili alla pratica. Si trattava dunque di vedere se un simile esito favorevole si potesse ottenere con molto minor quantità.

Perciò inoculai due cavie di circa gr. 250 con cmc. 0.02 dello stesso materiale; dopo 6 giorni inoculai in tutte, nel peritoneo, 6 DML di *B. coli*. Però morirono tutt'e due così rapidamente come i due controlli.

Volli allora vedere se la vaccinazione, ripetuta due volte con piccole dosi, fosse capace di dare esito migliore.

A tal uopo inoculai quattro cavie prima con 0.02 del materiale già detto, e dopo 8 giorni con una quantità 5 volte maggiore.

Dopo 6 giorni le inoculai nel peritoneo con 6 DML: due cavie morirono rapidamente come i controlli in 12 ore; una morì dopo 16 ore, l'altra sopravvisse dopo un periodo di grave malessere.

Dunque la duplice vaccinazione con piccole dosi non ha un effetto sicuro.

Però in altre esperienze ripetute con dosi alquanto maggiori, l'azione vaccinate fu netta. Tuttavia, siccome nella pratica la duplice vaccinazione offrirebbe degli inconvenienti, e siccome le dosi di vaccino dovrebbero essere troppo forti, volli vedere se fosse possibile usare una sola vaccinazione, con piccola quantità di materiale, adoperando il virus altrimenti trattato. Adoperai cioè colture di *B. coli*, ottenute seminando in brodo i germi già sviluppati nel terreno precedentemente accennato; dopo 5 giorni di termostato le uccidevo tenendole a 60° C per 2 ore, e le adoperavo come vaccino.

L'inoculazione di cmc. 0.1-0.2 di questo materiale salvò quattro cavie, inoculate 11 giorni dopo con 6 DML di *B. coli* nel peritoneo.

Nelle cavie riesce dunque bene la vaccinazione col *B. coli*, facendo una sola inoculazione di piccola quantità di materiale.

Volendo applicare ai bambini nei primi 2-3 anni di vita questo metodo di vaccinazione, ho voluto prima assicurarmi della innocuità del materiale stesso. A tale riguardo posso assicurare che l'inoculazione di cmc. 0.25 di questo vaccino sotto la cute del braccio dei bambini non produce che una debole reazione locale (tumefazione e arrossamento), una leggiera elevazione termica (37.4-37.5), le quali però scompaiono completamente in 2-3 giorni.

L'applicazione di queste vaccinazioni ai bambini, già iniziata colla cooperazione del prof. Spolverini, sotto la direzione del prof. Celli, ci dirà quale valore pratico spetti a questo metodo di profilassi contro le enterocoliti dei bambini.

V. Conclusioni.

1. Le agglutinine presenti nel siero passano in mediocre quantità nel latte e sono dimostrabili anche nel siero del lattante. Per il *B. coli* queste agglutinine però sono specifiche solo verso gli stipiti adoperati nell'immunizzazione.

2. Mentre le agglutinine passano tanto attraverso la mucosa gastrenterica del lattante quanto per quella dell'adulto, le sostanze battericide non passano (o forse passano trasformate in modificazioni inattive) neppure attraverso la mucosa del poppante.

3. Gli anticorpi battericidi passano però, in mediocre quantità, nel latte, e sono dimostrabili tanto con esperienze *in vitro* quanto *in vivo*.

4. Gli anticorpi battericidi verso stipiti virulenti si possono ottenere anche immunizzando con stipiti avirulenti; e in tal caso anche il latte acquista potere battericida verso i *B. coli* virulenti.

5. La produzione e il passaggio delle agglutinine sono assolutamente indipendenti dalla produzione e dal passaggio degli anticorpi battericidi, nè esiste fra essi alcun rapporto.

6. Contro le infezioni da *B. coli* non è utilizzabile il latte ottenuto da capre immunizzate, quantunque nel latte siano dimostrabili sostanze battericide. Ciò prova che l'affermazione del passaggio degli anticorpi attraverso la mucosa gastrenterica non ha valore generale, essendoci (considerando solo le cause più importanti) differenze notevoli fra le specie animali che si adoperano e fra le varie infezioni che si studiano.

7. Maggiori speranze di buona riuscita offre invece il metodo delle vaccinazioni.

LAVORI CITATI.

1. BAUER. *Durchgängigkeit des Magendarmkanals für Eiweiss- und Immunkörper ecc.* Arch. f. Kinderheilk., XLII, 5 e 6.

2. BEHRING E. *Tuberkulosebekämpfung.* Macburg, 1903.

3. BEHRING E. *Tuberkuloseenstehung, Tuberkulosebekämpfung und Säuglingsernährung.* Berlino, 1904.

4. BERTARELLI. *Intorno alle immunizzazioni attive e passive per le vie digerenti dei neonati e dei lattanti.* Riv. di Ig. e Sanità pubblica. Anno XVI, 1905.

5. BERTARELLI. *Sul passaggio degli ambocettori emolitici e delle precipitine nel latte degli animali immunizzati attivamente.* Giornale della R. Acc. di Med. di Torino. Anno LXIX, n. 5.

6. DE BLASI. *Sul passaggio degli anticorpi nel latte e loro riassorbimento per l'intestino dei lattanti.* Rivista di Clinica pediatrica. Anno III, n. 1, gennaio 1905.

7. DI DONNA. *Sull'agglutinamento del Batt. Coli.* Questi Annali, vol. XII, pag. 541.

8. DISSE. *Untersuchungen über die Durchgängigkeit der jugendlichen Magendarmwand für Tuberkelbacillen.* Berl. klin. Wochenschrift, 1903, n. 1.

9. FEDERICI. *Sull'assorbimento degli anticorpi specifici per la mucosa intestinale.* Questi Annali, vol. XVI, fasc. III.

10. FIGARI. *Sul passaggio delle agglutinine e antitossine tubercolari nel latte e loro riassorbimento per la via del tubo gastroenterico.* Rif. Med., 1905, n. 14 e 27.

11. FIGARI. *Sull'assorbimento dei mezzi difensivi contro la tubercolosi attraverso il tubo digerente.* Clin. Med. Ital., 1905, vol. 44, fasc. 7.

12. Cit. in KRAUS. *Über Antikörper in der Milch.* Centralbl. f. Bakt. Bd. XXI, 1897, p. 592.

13. JATTA. *Experimentelle Studien über die Agglutination des Typhusbacillus und der Microrganismen der Coligruppe.* Zeitsch. f. Hyg., XXXIII.

14. RÖMER. *Untersuchungen über die intrauterine und extrauterine Antitoxinübertragung von der Mutter auf ihre Deszendenten.* Berlin. klin. Wochenschr., Bd. XXXVIII, 1901.

15. Cit. in RÖMER. *La teoria delle catene laterali.* Torino, 1905.

16. RÖMER u. MUCH. *Antitoxin u. Eiweiss.* Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. XIII, n. 6.

17. SALGE. *Ueber den Durchtritt von Antitoxin durch die Darmwand des menschlichen Säuglings.* Jahrb. f. Kinderheilk. LX, 1904.

18. SALGE. *Immunisierung durch Milch.* Jahrb. f. Kinderheilk. LXI, p. 486, 1905.

19. STRONG R. P. *Some questions relating to virulence of microrganismes, with particular reference to their immunizing powers.* Dep. of the Int. Bureau of Gov. laboratories. Manila, n. 21, oct. 1904.

20. UFFENHEIMER. *Esperimentelle Studien über Durchgängingkeit der Wandungen des Magendarmkanals neugeborner Tiere für Bakterien und genuine Eiweissstoffe.* Arch. für Hyg. Bd. LV, p. 1.

21. WOLF S. *Beiträge zur Lehre der Agglutination mit besonderer Bezugnahme auf die Differenzierung der Coli- und Proteusgruppe und auf die Mischinfectionen.* Centralbl. f. Bakt., 1899, Bd. XXV, p. 311.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Studî sul vaccino

Indagini sulla presenza del virus vaccinico nella polpa vaccinica e nei filtrati attraverso le Berkefeld W.

Ricerche del prof. O. CASAGRANDI.

Allorchè ebbi assodato che il virus vaccinico, passava sicuramente attraverso quelle candele porose che non si lasciavano attraversare da alcun batterio visibile, volli tentare di metter in evidenza il germe del vaccino, nei filtrati e nella polpa vaccinica.

Riferisco nel presente lavoro le varie indagini fatte distinguendole in quattro capitoli:

l'uno sui tentativi per mettere in evidenza, nel pus vaccinico, altri germi all'infuori dei comuni batteri;

l'altra sui tentativi per mettere in chiaro nella polpa vaccinica e nei filtrati il virus vaccinico all'infuori delle comuni e note forme di esseri viventi;

il terzo sui tentativi per coltivare il virus stesso dai filtrati;

il quarto riguardante la ricerca del virus nelle lesioni vacciniche.

I.

Indagini sulla presenza di germi nel pus vaccinico, all'infuori dei comuni batteri.

A quest'ordine di ricerche, mi accinsi dopo le prime notizie sull'etiologia spirochetica della sifilide.

Colorata la polpa vaccinica col metodo di Giemsa e osservati i preparati coi più forti ingrandimenti, non riuscii però a scoprire alcun elemento che mi potesse riportare all'idea di uno spirochete.

In seguito, ritornai su queste ricerche servendomi dei metodi Bertarelli-Volpino e Levaditi, che feci seguire dalla colorazione del Giemsa, opportunamente riducendoli nei momenti vari del trattamento, e anche sostituendoli con un procedimento personale basato però sullo stesso principio.

Sono così riuscito a mettere insieme un certo numero di osservazioni microscopiche, le une riguardanti quelle che chiamerei *forme filamentose del vaccino*, e le altre riguardanti quelle che chiamerei *ammassi granulari* del vaccino.

A) — Forme filamentose del vaccino.

Dapprima la polpa vaccinica fresca, tratta da pustole sviluppatesi sulla cute dei cani, veniva distesa sopra vetrini e parte trattata col metodo Bertarelli-Volpino, parte con quello Levaditi-Manouellan (1). Anche delle pustole venivano escise in toto e trattate con gli stessi metodi.

In seguito, ricorsi per la polpa vaccinica a questo procedimento:

fissazione e impregnazione per 10 minuti in alcool metilico col 0,2 % di NO_3Ag. preparato da poco;

lavaggio in acqua distillata;

passaggio in acido pirogallico al 4 % per 40-60 minuti ricambiandolo 2-3 volte;

lavaggio in acqua distillata;

colorazione col Giemsa non diluito per 5 minuti;

lavaggio in acqua corrente e poi in acqua distillata.

Con questo procedimento, nel campo microscopico, apparvero in mezzo a gran numero di elementi diversi, dei filamenti ondulati, tutti omogeneamente colorati in bleu, alcuni molto lunghi, altri più corti.

Benchè non si trattasse di spirocheti, tuttavia, attesa l'osservazione del Bonoff sopra uno *Spirochaete vaccinae*, insistei per mettere in evidenza i particolari di tale reperto, colorandolo, dopo avergli fatto subire i vari trattamenti che servono a mettere in evidenza gli spirocheti.

La Casagrandi-Rossi, cui affidai questa parte del lavoro, riuscì così colorando col metodo Levaditi-Giemsa a trovarli nella polpa vaccinica, colorati in rosso carminio, ma molto ridotti in ispessore. Si trattava di filamenti spesso lunghissimi (fino a 30 e più μ) sottili, colorati in modo da non esser possibile differenziare il contenuto in elementi diversi, diritti per lunghi tratti, ondulati per altri, qualche volta ripiegati per metà, qualche altra, con un estremo più assottigliato.

(1) Compt. rend. Soc. de Biol. Gennaio, 1906.

A considerarli attentamente appare evidente la somiglianza con le forme osservate dal Mühlens e dall' Hartmann (1) negli animali inoculati di polpa vaccinica e che gli autori vorrebbero far derivare dai nuclei (dei leucociti).

Certo non si tratta di spirocheti; anche volendo ammettere che questi nei preparati per striscio si distendano, non è possibile ammettere una distensione tale da far scomparire del tutto le spire.

Il sospetto, d'altro canto, che avevo si trattasse di ifi di streptotix è stato smentito dall'esperimento. Tali ife si colorano in bleu col metodo Levaditi-Giemsa, sono molto più spesse, e il loro contenuto non è mai omogeneo.

Intanto è anche certo che questi filamenti non si trovano nelle sezioni delle pustole, i tratti filamentosi che si osservano, a fasci generalmente, non si colorano mai in rosso-carminio, ed è facile persuaderci che si tratta di fibrille connettivali (2).

Per cui concludendo, nel pus vaccinico *si possono trovare dei filamenti particolari che non hanno relazione alcuna con gli spirocheti e neppure con altre forme batteriche (le streptotricee), la cui natura non è bene precisabile, ma che tutto dà a credere, attesa la loro mancanza nel tessuto pustolare, non abbiano che vedere con esseri viventi.*

Intanto è certo anche che essi non possono rappresentare il virus vaccinico: non passano tra l'altro, attraverso i filtri di Chamberland e di Berkefeld. Nei filtrati attivi non ho mai rinvenuto di tali forme.

II.

Indagini per mettere in evidenza il virus vaccinico nella polpa vaccinica e nei filtrati.

A. — Nella polpa vaccinica.

Dirò anzitutto che colorando il pus vaccinico, disteso in sottile strato su vetrini coproggetti o portoggetti, coi metodi Levaditi-Giemsa il fondo del preparato appare di un colorito verde erba: tale è la tinta che assumono i leucociti, i detriti cellulari e i filamenti di fibrina. Ora, su questo fondo verdastro, appare qua e là un finis-

(1) Centr. f. Bakt. Orig. I. abt. XLI, 1906.

(2) Va ancora notato che nel pus vaccinico, specie se si raccoglie dal fondo delle pustole e si striscia sul vetrino, si possono trovare dei filamenti fibrinici che, se isolati, possono simulare perfettamente degli spirocheti: è però facile accorgersi dell'errore, non foss'altro perchè gli elementi fibrinici si trovano sempre in altre parti del preparato più o meno numerosi, anastomizzati. Su queste forme ha fermata l'attenzione il Carini, (Centr. f. o. Bakt. XXXIX, 1905), come sulle altre l'ha fermato il Süppfe (Centr. f. Bakt. XL, 1906).

simo materiale granulare di un colorito con lieve tendenza al giallognolo. Che ci siano rapporti tra il materiale granulare, che si colora in questo modo e quello dato dai detriti cellulari che si colora in verde erba, non sembra; però, in certi preparati (non bene lavati) ci sono degli ammassi di materiale granulare che presentano delle tonalità di colore intermedio.

In tutti i modi, questi granuli non hanno che vedere coi precipitati di sali d'argento che si trovano nei preparati, spesso anche abbondantissimi, e che possono essere anche finissimi. Come pure essi non hanno che fare con gli ammassi delle forme cocciche che col metodo Levaditi-Manouellan-Giemsa appaiono ad accumuli ben netti colorati in nero.

Esiste dunque nel pus vaccinico un particolare materiale detritico.

Vediamo ora come esso si comporti opportunamente colorato.

Fra le sostanze coloranti atte a metterlo in evidenza, si presta alquanto la fuxina carbolica. Con essa il materiale detritico assume una lieve tinta rosea ed è possibile accertare che le massoline sono estremamente piccole. Occorre però, far prima agire o il procedimento Levaditi-Manouellan oppure, ciò che è più semplice, la fissazione in alcool metilico.

Il liquido del Giemsa, in queste condizioni di fissazione del materiale, raggiunge anche esso lo scopo di colorare i granuli: anzi *mette anche in evidenza delle zolle di materiale granulare che si colorano in rosso-carminio.* E il numero delle zolle cresce se si fa precedere la fissazione in acido fosfovolframico al 2 % ed alcool col metodo del Raetzmann: solo che i componenti invece di assumere la tinta rosso-carminio, assumano una tinta bleu intensa.

Particolari relativi alla forma, alle dimensioni degli elementi delle zolle è impossibile stabilirli anche osservando coi più forti ingrandimenti.

B. — Nei filtrati attraverso le Berkefeld W.

Già dalle ricerche da me fatte l'anno scorso, risultava la possibilità di trovare nei filtrati di vaccino un materiale detritico che si poteva mettere in evidenza colorando coll'azzurro II e l'eosina, previo trattamento col metodo di Raetzmann per la colorazione dello spirochaete di Schaudinn.

Naturalmente tali ricerche non potevano rimanere sole. Le ho quindi ripetute e completate.

All'uopo mi sono servito dei filtrati centrifugati a mezzo di centrifuga idraulica e ancora dei filtrati precipitati per mezzo di sostanze chimiche e di sieri.

Il materiale, comunque raccolto in fondo di tubi, veniva, dopo pipettato il liquido sovrastante al deposito, deposto coll'ago di platino sterile

su vetrini portoggetti perfettamente puliti e sterilizzati e subito fattone preparati a goccia pendente e preparati essiccati da fissare e colorare.

Preparati a goccia pendente. — Faccio anzitutto rilevare che i filtrati di vaccino, sui quali ho maggiormente fermato la mia attenzione, sono quelli ottenuti attraverso le Berkefeld W. Essi appaiono, quando la triturazione è stata ben fatta, limpidi, e appena appena opalescenti guardati a luce trasversa. L'opalescenza poi cresce nelle 24 ore, raggiungendo un dato limite, oltre il quale più non aumenta. Naturalmente il mezzo di diluizione è stato il $NaCl$ al 0.85 %.

Centrifugati questi liquidi, non perdono, ma diminuiscono la loro opalescenza. Al fondo delle provette si nota un deposito nebuloso e tutto attorno alla provetta si depone un materiale pellicolare. Il liquido pipettato è perfettamente limpido, ciò che dimostra che l'opalescenza è data dal materiale depostosi sulle pareti.

Esaminato quest'ultimo, appare costituito da lamelle del tutto amorfe.

Il materiale costituente il deposito nebuloso, *appare invece costituito da corpiccioli estremamente piccoli, rifrangenti, isolati e aggruppati in ammassi irregolari, immobili o dotati di un debole movimento browniano.* Non è possibile stabilirne nè la forma, nè le dimensioni; certo sono inferiori a un quarto di μ. Negli ammassi essi hanno una tinta lievemente tendente al gialliccio e ricordano perfettamente quelli osservati nella polpa vaccinica non filtrata.

Preparati colorati. — Se il materiale non si fissa, non prende alcuna colorazione. Facendo precedere la fissazione con l'alcool metilico e poi colorando col Giemsa diluito, i risultati sono migliori.

Gli ammassi granulari appaiono di una tinta paonazza, e fra di essi se ne notano di un bel colorito rosso-carminio.

Se si fa precedere la fissazione coll'alcool e l'etere, questi particolari si mettono meno bene in evidenza. In tutti i modi il liquido del Giemsa appare il migliore colorante. Segue la fuxina carbolica che li colora lievemente in rosso.

Facendo precedere alla colorazione il trattamento col nitrato d'argento secondo il metodo Bertarelli-Volpino, riducendo i tempi per evitare la precipitazione dei sali d'argento, il materiale detritico appare sempre evidente e pare, colorando col Giemsa successivamente, che tenda ad assumere un colorito bluastro.

Procedendo nello stesso modo, ma col metodo Levaditi, la colorazione bluastra del materiale appare più netta. Però, non è possibile mai, anche osservando a lungo e coi più forti ingrandimenti i preparati, ritrovare negli elementi granulari tali caratteri da poterne fare una descrizione particolareggiata. A volte pare che i singoli elementi degli ammassi non siano fra di loro eguali, altre volte pare risultino dalla fusione od unione di massoline più piccole.

Facendo precedere invece il trattamento col metodo di Raetzmann il materiale ora descritto, risalta molto bene e può anche colorarsi con la fuxina carbolica, col liquido di Nicolle, col bleu boracico oltre che col Giemsa diluito.

Nei preparati colorati con la fuxina, le massoline granulari appaiono nettamente colorate in rosa, riunite in ammassi di forma irregolare qua

e là per tutto il campo microscopico. Nei preparati colorati col liquido Nicolle appare specialmente rilevante la fine granulosità degli ammassi: quasi parrebbe, certe volte, di poter definire i singoli granuli componenti gli ammassi.

Fissando infine il materiale in sublimato idroalcoolico, secondo le indicazioni del Prowageck, e poi colorando con l'ematossilina, si colora del pari discretamente il materiale detritico: esso assume un colorito che tende leggermente al pavonazzo. Serve bene l'ematossilina Bizzozero e meglio ancora quella Delafield diluita che occorre far agire 24 ore.

Preparati dei sedimenti dei filtrati (*trattati con sostanze chimiche o con siero*). — Colorando il sedimento che si forma nei filtrati, con l'aggiunta di siero di coniglio ripetutamente trattato coi filtrati stessi, si osserva, ove si usi il liquido di Giemsa diluito, come colorante, il solito materiale granulare colorato in rosso-carminio, molto pallido, però. Di più il reperto non è abbondante.

Lo stesso si dica se si precipita il filtrato con siero di cane trattato: solo gli ammassi assumono una netta tinta rosso-carminio.

Colorando infine i precipitati dei filtrati ottenuti per mezzo del NO_3 Ag al 0.25 % si trovano accanto agli ammassi granulari dovuti ai sali d'argento i quali, colorando col Giemsa, assumono un colorito violetto, degli altri *ammassi a granuli finissimi di un bel colorito rosso-carminio* in tutto simili a quelli già osservati nei filtrati centrifugati.

***

Come appare dalla descrizione dei vari preparati ottenuti con diversi trattamenti, ciò che ferma l'attenzione per la sua costanza è questo fino materiale granulare ammassato, che assume con dati procedimenti una tonalità rosso-carminio colorandolo col Giemsa diluito e che si può mettere anche in evidenza ma meno bene con altre colorazioni, tra cui con la fuxina e con l'ematossilina senza però poterlo bene differenziare dal restante materiale detritico.

Esso, risponde anche ai caratteri di quello che con metodi analoghi si mette in evidenza nella polpa vaccinica.

È dunque logico concludere col dire che tanto nel *pus vaccinico* quanto *nei filtrati esiste un particolare materiale detritico che si colora in rosso-carminio col metodo del Giemsa.*

Si tratta del germe del vaccino?

L'esperimento fatto inoculando il deposito dei filtrati sulla cute dei cani e sulla cornea dei conigli, già riferito nell'altro lavoro, dimostra per lo meno che esso lo contiene.

Le ulteriori ricerche fatte, che riferisco in seguito, in questo stesso lavoro, innestando i depositi nella cornea dei conigli, avvalorerebbero tale ipotesi.

Intanto qui aggiungerò che analoghe ricerche ho ripetuto sui filtrati di manifestazioni sifilitiche, primarie, secondarie, terziarie con esito del tutto negativo; mentre invece nei filtrati di polpa di mollusco contagioso, lesione che ormai si ritiene data con virus invisibile ho ritrovato dei corpi che si diportano in modo analogo e che si riportano ad altri che si ritrovano nei corpuscoli del mollusco.

E ancora aggiungerò che del pari analoghe ricerche fatte sui filtrati dello sputo di pertossici e anche sullo sputo stesso non filtrato, non avrebbero condotto a mettere in evidenza un reperto simile in tale materiale, mentre alcune esperienze mi farebbero almeno sospettare, che la pertosse sia data da un virus ultramicroscopico (1).

III.

Tentativo per coltivare il virus esistente nei filtrati.

Dopo quanto avevo assodato circa l'attività dei filtrati batteriologicamente sterili, ottenuti attraverso le Berkefeld W. e le Chamberland F., era naturale dovessi pensare di coltivare il virus.

Allo scopo mi sono servito dei più svariati terreni, il cui numero, quando si pensi che dal 1903 ad oggi, sono andato facendo di tali prove, somma a qualche centinaio.

Dirò soltanto che ho innestato il filtrato tal quale o centrifugato nei comuni terreni (brodo e agar) che si usano in batteriologia, tali e quali, neutralizzati, alcalinizzati in vario grado, con aggiunta di sangue di 25 diverse specie di animali, tra mammiferi, rettili ed uccelli, di sieri, di zuccheri diversi, di glicogeno, di amido, di albumina d'uovo, di ematogeno, ecc. Ho anche fatto brodi di cute di vitello, di cane o semplici macerati a 0°, filtrati alla Chamberland e ad alcuni ho anche aggiunto del materiale cellulare che raschiavo dalla cute, dall'interno all'esterno, per non racccogliere i primi strati che sono tanto ricchi di germi.

I tubi o le piatte semenzate erano lasciate a temperatura ordinaria, all'oscuro, o entro il termostato a 37° e poi esaminati a vari intervalli di tempo, dopo 36, 48 ore e a seconda dei casi via via sino a 1-2 e persino 6-7 mesi.

---

(1) Non riferisco nel presente lavoro i dettagli di queste ricerche, dacchè ho preferito di pubblicarli a parte.

Quelle sul mollusco contagioso furono comunicate alla Soc. dei cultori delle sc. med. e nat. in Cagliari, nella seduta del 7 luglio 1906.

Le altre sulla tosse convulsa sono pubblicate nel *Policlinico*, sez. pratica, 1906.

Il risultato fu costantemente identico; negativo.

Lo stesso materiale granulare colorabile in rosso-carminio col Giemsa, scomparve.

Stando così le cose, pensai da un canto di aggiungere ai filtrati sterili delle sostanze sterilizzate in modo da trasformarli in liquidi colturali e dall'altro di rifare la prova aggiungendo tali sostanze prima ancora della filtrazione in modo da ottenere dei filtrati sterili che le contenessero di per sè.

La maggior parte di queste prove sortirono esito negativo: però in certi filtrati trovai, dopo vario tempo, un deposito costituito da elementi che si mettevano in evidenza colorando col liquido di Giemsa e che erano rappresentati, osservati a forti ingrandimenti, da sferuline di diversissime dimensioni, senza che in esse si potesse notare una distinzione tra contenente e contenuto. Esse erano colorate in rosso-carminio, e non raggiungevano, le più grandi, le dimensioni di un piccolo cocco. Assolutamente poi non era possibile alcuna confusione con alcuna batteriacea.

Per lungo tempo rimasi incerto sulla natura di questi elementi e provai se si ottenevano in altri filtrati e senza la presenza del vaccino.

E forse non avrei data ad essi una grande importanza, ove non li avessi trovati anche in un deposito di un filtrato di 4 mesi assolutamente sterile. Questo *filtrato inoculato sulla cute dei cani si mostrò attivo*. Non posso dire se un tale reperto stia in relazione coll'agente del vaccino: certo vi sono elementi per sospettarlo.

Intanto, attesi questi risultati, non posso in alcun modo confermare la coltivabilità del germe del vaccino ammessa recentemente dal Proscher (1).

Anzi a proposito del lavoro di quest'A. che ritiene ancora il virus non filtrabile eppure — per la sua grande rifrangenza — invisibile, non posso a meno di rilevare come attesa la tecnica da lui seguita, non mi persuadano le conclusioni a cui è venuto.

Egli rileva infatti l'avvenuto sviluppo del virus su mezzi solidi da un particolare sviluppo sullo striscio. Ora, occorrerebbe saper bene se l'innesto venne fatto con materiale molto ricco di glicerina, dacchè il fenomeno in tale caso si verifica anche se non si semina alcun materiale: lungo lo striscio si produce un apparente sviluppo.

D'altra parte egli trova che il materiale semenzato, produce, innestato sulle vitelle, delle caratteristiche pustole e la caratite vaccinale nella cornea dei conigli e delle cavie, ma però solo se detto materiale è dei primi passaggi. Ora, come si può escludere che le vitelle e le cornee dei conigli e delle cavie

(1) Centr. f. Bakt., I Abt. orig., genn. 1906.

siano state inoculate addirittura col virus vaccinico? come si può ammettere che sia il virus *coltivato* quello che le produce?

E lo stesso si dica delle colture in brodo.

Del resto, per fare le semine, l'A. si è bensì servito di linfa limpida come l'acqua e priva al microscopio di forme visibili, ma egli l'ha ottenuta per centrifugazione e non per filtrazione. Basta aver lavorato solo un poco sul virus vaccinico per farsi la convinzione che con la centrifugazione, specialmente della linfa, non si riesce a depurarla e d'altro canto, tutte le ricerche fatte sui filtrati da me, dimostrano che anche filtrati limpidissimi e che all'esame microscopico parevano sterili, sottoposti all'esame colturale si mostrano inquinati da un piccolo cocco piogeno! Anzi questo, certe volte, si riesce a trovare con procedimenti particolari, anche in certi filtrati che si direbbero assolutamente sterili anche all'esame batteriologico ordinario!

Per conto mio, quindi, ritengo che sino ad ora, ***nessuno abbia coltivato il virus vaccinico.***

IV.

Ricerca del virus nella lesione corneale vaccinica.

Ho inoculato la cornea di conigli con filtrato vaccinico attraverso la Berkefeld W o più semplicemente il deposito dei filtrati centrifugati.

Qualunque sia la tecnica eseguita per l'inoculazione endocorneale, mai prima del secondo giorno, anche illuminando la cornea, mi è riuscito di scoprire qualche lesione speciale.

Al 3° o al 4° giorno ho notato, anche senza illuminare la cornea, dei tratti rilevati in corrispondenza dei punti di innesto endocorneale.

Questi tratti rilevati, non rare volte, erano in numero svariato anche attorno al punto di inoculazione.

Per lo più vari, spesso anche tutti, finivano per confluire, mentre la cornea si opacava e poi lo strato epiteliale finiva col cadere e con il rimanere un'ulcera di forma irregolare, spesso molto estesa, altre volte limitata.

Naturalmente accanto al fenomeno microscopico che caratterizza la cheratite vaccinale, ho anzitutto fissata la mia attenzione a quella microscopica, cioè alla presenza del *cytoryctes* del Guarnieri.

Fissando i globi oculari in sublimato acido e poi dopo gli opportuni passaggi incluse le cornee, sezionatele e colorate le sezioni con ematossilina (usi quella di Delafield o quella di Heidenhaim) o con tionina, non ho potuto mai assistere ad un fenomeno microscopico così imponente per nu-

mero di *cytoryctes* come quello che si osserva coll'inoculazione di polpa vaccinica attiva.

Il fenomeno del Guarnieri si ha certamente: però il reperto cytorictico è incomparabilmente più scarso di quello che si osserva colla inoculazione dell'ordinaria polpa vaccinica.

Per un momento mi parve possibile che l'ottenere più numerosi i *cytoryctes* stesse in rapporto con la presenza, nel pus vaccinico e quindi nei filtrati di piogeni in condizioni di incoltivabilità nei comuni terreni e che quindi la lesione guarneriana avesse la stessa etiologia della lesione pustolare, tanto più che la trasmissibilità in serie della lesione ottenuta con tali filtrati era più duratura.

Però, esaminando da vicino i fenomeni che si susseguono in seguito all'inoculazione endocorneale dei filtrati, seguendo due diverse tecniche di inoculazione, mi apparve evidente, che la produzione del *cytoryctes* è anche legata alla tecnica eseguita.

In generale per tutta la palizzata cellulare, appaiono i segni di una flogosi dell'epitelio, dacchè si formano delle vere vescicole intraepiteliali a contenuto sieroso, nel quale cadono cellule epiteliali sfaldate, nuclei di leucociti, ecc.: d'altro canto non mancano le cellule in fase cariocinetica.

Però, ripeto, varia l'intensità dell'infiltrazione leucocitaria e con essa il numero dei *cytoryctes* a seconda della tecnica di inoculazione.

Nelle cornee in cui l'inoculazione è stata fatta per infissione endoepiteliale con una lancetta o un ago sottilissimo, non evvi traccia o quasi di infiltrazione leucocitaria in corrispondenza della lesione, si trovano le cellule che sono in genere più gonfie col nucleo che conserva i suoi caratteri tintoriali: solo nel protoplasma e rare volte, si nota qualche punto un po' colorato, del colore del nucleo.

Allontanandosi dal punto della lesione, per trovare qualche leucocito è chiaro che in queste cornee la corrente migratoria pare sia venuta a cessare prima ancora di raggiungere le cellule più periferiche.

Però, attira l'attenzione qualche leucocito, il cui nucleo è in evidente fase di frammentazione, in seguito alla quale si originano dei corpi granulari, che rispondono a quelli che si trovano entro le cellule più periferiche dell'epitelio.

Nelle cornee invece in cui si è scarificato l'epitelio e gocciolato per lungo tempo sopra il filtrato, permane l'infiltrazione leucocitaria, si può assistere, per alcuni tratti, a una fitta invasione di leucociti la quale, tende in alcuni punti, nel dirigersi verso la superficie dell' epitelio, ad essere così intensa da dover dire che non vi è cellula che non sia circondata da cellule migrate. In queste cornee si finisce sempre con l'avere l'ulcerazione dell'epitelio stesso, ma non la pustolazione.

Orbene, osservando la periferia di queste zone di infiltrazione, si trovano dei corpuscoli endocellulari chiarissimi, i quali assumono intensamente, come i nuclei dei leucociti i colori anilinici e tutti, nessuno escluso, sono circondate da uno spazio chiaro incolore.

Osservando attentamente i punti ora descritti di maggiore infiltrazione

leucocitaria, ho notato che essi rispondono ai punti più declivi della cornea, dove cioè il filtrato si è mantenuto a lungo come in una sacca, e che corrisponde precisamente al punto in cui erano state fatte scalfitture superficiali con l'ago.

Parrebbe quindi che dei due procedimenti tecnici di innesto endocorneale, quello della scarificazione coll'ago seguito dal gocciolamento del filtrato sul punto scalfito per un tempo molto lungo dia luogo a un maggiore afflusso leucocitario insieme ad un maggior numero di *cytoryctes* di quello che si ottiene coll'innesto per tasche.

Del resto, anche senza entrare nella ardua quistione della origine dei *cytoryctes* è certo che la cheratite vaccinale, che si ottiene coi filtrati, per reperto microscopico, non è paragonabile a quella che si ha coll'innesto del vaccino puro e che coi passaggi successivi da cornea a cornea si può ancora ottenere la lesione senza il reperto citorictico come ho già fatto rilevare nell'altro lavoro.

***

Intanto, mi preme fermare l'attenzione sopra un altro reperto. Come ho notato nelle cornee sezionate e colorate con l'azzurro e l'eosina, previo trattamento col metodo di Raetzmann, trovai degli elementi piccolissimi, di apparenza detritica, che mi richiamarono alla mente quegli osservati nei filtrati.

Ho ora insistito su queste ricerche, cercando specialmente di perfezionare la tecnica per potere allestire dei preparati permanenti.

Pur non essendo riuscito in questo ultimo intento, tuttavia mi pare di avere assodato tali fatti da meritare d'essere presi in considerazione.

Anzitutto nelle cornee inoculate con vaccino filtrato e nelle quali la infiltrazione leucocitaria è scarsa o assente negli strati periferici delle cellule, si notano tra le cellule stesse, qua e là come dei tratti granulari finissimi che si colorano in rosa: questi tratti rappresentano, qualche volta dei veri cumuli granulari nei punti in cui tre cellule si toccano e lasciano come uno spazio lacunare.

Nell'interno delle cellule più periferiche, ma non in tutte, si trovano elementi di tal genere, riconoscibili per il loro colorito rossocarminio pallido: essi sono riuniti o sparsi nel protoplasma cellulare; se ne osservano anche in corrispondenza col nucleo: però questi mi pare si trovino in altro piano.

Nelle cornee in cui la infiltrazione leucocitaria non è intensa questi granuli si trovano adesi ai primi strati dell'epitelio, e pare

che i leucociti accorrano tutti alla superficie della cornea come per proteggere l'epitelio dall'azione di questi elementi.

Io non posso, nè saprei aggiungere altri particolari, su questo reperto microscopico.

Solo dirò che in alcuni tratti cuneiformi dell'epitelio, dove la parte superficiale della palizzata epiteliale veniva a distaccarsi dal resto e si venivano a formare delle sacche, tratti che rispondevano a punti d'innesto, ho osservato dei corpi che hanno fermato la mia attenzione e il cui contenuto mostrava di colorarsi in rosa e di avere un aspetto detritico identico a quello già descritto per gli elementi infra- e intracellulari. Si trattava di corpi ovoidali o sferici, aderenti alla palizzata epiteliale, grandi press'a poco metà di una cellula. Ne ho osservati parecchi e benchè coi comuni procedimenti essi potessero confondere con cellule a nucleo cromatolizzato, tuttavia, non mi pare si possa con sicurezza dare loro, colorando il materiale col Giemsa, una tale interpretazione.

La loro presenza ha richiamato in me l'idea di corpuscoli del mollusco: però non mi è stato possibile rinvenirvi la stessa struttura, che ho trovato in questi ultimi, e che mi ha spinto a interpretarli di natura protozoica.

Avranno essi relazione col materiale detritico che si trova nei filtrati e nelle cellule corneali?

Comunque sia, a parte questa formazione, il materiale detritico infra- e intracellulare a me pare debba avere un'importanza che finora è passata inosservata tanto più che evvi chi ammette che il virus sia anche extracellulare come il Prowazech.

Se si leggono ora i vari lavori che parlano di fini granulazioni nelle cellule corneali inoculate con vaccino è ben vero che si trova in essi l'accordo sulla presenza di granulazioni della grandezza di batteri e più piccole ancora e di granulazioni finissime, come la cosiddetta *polvere cromatica del Gorini* (1) e i cosiddetti *corpuscoli cromatici del Bosc* (2), appena visibili coi più forti ingrandimenti, isolati o riuniti entro le cellule.

Ma tali elementi sono facilmente riconoscibili e non si trovano mai così numerosi ed io non saprei riconoscerne la localizzazione extracellulare, la quale invece è propria delle formazioni granulari da me messe in evidenza.

Ritengo quindi che *il materiale da me descritto sia assolutamente diverso da quello del Gorini, del Bosc,* ecc.

Che esso abbia relazione coi cosiddetti *corpuscoli iniziali* del Prowazech (grandi μ 1-1,5, racchiusi in un alone limpido e includente dei granuli cromatici di grandezza varia) da me non è possibile ammettere. Questi cor-

(1) R. Acc. med. di Roma 1901 e Pavia 1900.
(2) Cent. f. Bakt. I Abt. Orig. 1904, p. 147.

puscoli iniziali del Prowazech nelle sezioni non mi è riuscito di vederli. Solo nella polpa vaccinica ho trovato delle forme che potrebbero essere quelle descritte dall'autore.

Neppure mi è stato possibile metterli in rapporti con *cytoryctes* disgregati: nessun dato evvi per ammettere una tale origine.

Poteva soltanto restare dubbio risultassero dalla disgregazione dei nuclei leucocitari, specie dopo l'osservazione fatta della loro facile frammentabilità.

Però i nuclei dei leucociti che così si riducono sono relativamente pochi: è d'altronde, il materiale, sempre più grossolano, meno ammassato e nell'insieme anche costituito da materiale detritico meno regolare.

Conclusioni.

I. Nel pus vaccinico si possono trovare delle forme filamentose, molto lunghe ed ondulate, che si colorano in bleu o in rosso-carminio col liquido del Giemsa, a seconda dei procedimenti adottati (Casagrandi, Levaditi-Giemsa), e che paiono anche più o meno spessi.

Esse non hanno alcun rapporto colle forme batteriche note, si *può escludere che siano degli spirocheti*, non esistono nel tessuto pustolare, non passano attraverso le candele porose, *non hanno che vedere col virus.*

II. Nel pus vaccinico si osserva, con particolari metodi di colorazione un materiale detritico, in cui si differenziano delle zolle, che assumono col liquido del Giemsa una colorazione rosso-carminio.

Lo stesso materiale si ritrova nei filtrati ottenuti attraverso le Berkefeld W: esso mostra di colorarsi, dopo il trattamento del Raetzmann, con la fucsina e il liquido di Nicolle, dopo la fissazione usata da Prowazech, coll'ematossilina e, specialmente dopo fissazione coll'alcool metilico o trattamento col metodo Bertarelli-Volpino e Levaditi, col liquido di Giemsa.

III. Il materiale detritico è costituito da elementi, la cui forma e grandezza non è nei preparati colorati bene precisabile; nei preparati a goccia pendente parrebbe di vederlo costituito di granulini finissimi, immobili e rifrangenti.

IV. Non si può stabilire con sicurezza il rapporto tra virus vaccinico e questo particolare materiale detritico: certo esso riproduce le lesioni vacciniche e si trova in quelle corneali: non si trova invece nei filtrati di lesioni non prodotte da virus ultramicroscopici (sifilide), e almeno, sotto aspetto analogo e con eguale comportamento verso

il Giemsa, si trova nei filtrati di materiale che tutto dà a credere contengano dei virus invisibili (mollusco contagioso, tosse convulsa).

V. I filtrati contenenti il virus vaccinico, seminati nei più diversi terreni, li lasciano completamente sterili. In alcuni filtrati in cui venne fatta l'aggiunta di sostanze nutritive si sono trovati dei corpicciuoli sferulari di diverse dimensioni colorabili in rosso-carminio col Giemsa, i quali si può escludere che abbiano qualsiasi rapporto con forme coccacee; non si osservano nelle soluzioni nutritive di controllo: d'altro canto i filtrati che contengono questi elementi sono ancora attivi sulla cute dei cani.

Con tutto ciò non si può concludere che il virus vaccinico siasi coltivato e non si può ammettere che a tale risultato sia addivenuto il Proscher con linfa vaccinica neppure filtrata, ma semplicemente centrifugata.

VI. Nella lesione vaccinica corneale prodotta dai filtrati i *cytoryctes* si producono sempre scarsi: il loro numero varia a seconda della tecnica d'innesto eseguita; essi sembrano essere in relazione coll'infiltrazione leucocitaria; in tutti i modi scompaiono nelle successive lesioni trasmesse da cornea a cornea.

VII. Tra le cellule epiteliali e dentro le stesse cellule, opportunamente colorando la palizzata epiteliale col liquido del Giemsa, si mette in evidenza un materiale detritico che risponde ai caratteri di quello osservato nei filtrati e si può escludere abbia rapporti di origine coi nuclei leucocitari, con quelli delle cellule epiteliali corneali e che non risponde nè alla polvere cromatica del Gorini, nè alle granulazioni batteriche del Bosc, ecc., nè ad altri corpi sino ad ora descritti nel pus vaccinico e nella cheratite vaccinale.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Studî sul vaccino

Indagini sul momento etiologico della pustolosi vaccinale

per il prof. O. CASAGRANDI.

Durante le numerose ricerche fatte sull'etiologia del vaccino e particolarmente sulla produzione della pustolosi, ebbi più volte a conchiudere che nella pustolosi cutanea non si poteva escludere l'intervento dei piogeni, anzi di un particolare piogene aureo.

Completo ora tali conclusioni esponendo le ricerche eseguite su questo micrococco.

Dirò subito che nel procedere all'esame batteriologico di un campione di vaccino, onde mettermi nelle condizioni più sicure di esperimento ho eseguito tutte le volte che mi è stato possibile tre ordini di ricerche:

1) innesto nei comuni terreni;

2) semina in brodo in sacchetti di collodion, che collocavo nel peritoneo dei conigli;

3) innesto del vaccino sulla cute dei cani ed esame batteriologico del contenuto delle pustole.

Or bene, con l'uno o l'altro di questi mezzi sono sempre riuscito a isolare dal vaccino fresco e fatte poche eccezioni da quello conservato *capace di dare pustole cutanee*, il micrococco in discorso; nessun altro germe coltivabile si è mostrato con maggiore frequenza nel pus vaccinico e nelle pustole vacciniche: nessun germe quindi poteva attirare la mia attenzione come questo.

D'altronde, il Sanfelice e il Malato avevano affermato che identica al vaiolo doveva essere l'etiologia del vaccino e nel vaiolo gli autori avevano trovato un particolare stafilococco piogene aureo: solo il cocco del vaccino pareva loro dovess'essere incoltivabile.



Come primo gruppo di ricerche cercai le ragioni per cui il più delle volte, realmente il micrococco da me isolato fosse rimasto incoltivabile nei comuni terreni, dal vaccino ordinario.

Pensai perciò di mettere le colture dello stafilococco nelle stesse condizioni, in cui si trova il germe nella polpa vaccinica che è in commercio.

Patine sviluppatesi in agar a becco di clarino, emulsionai in glicerina diluita (1 cmc. di glicerina, 2-3 cmc. di acqua) e posi il materiale, parte a 37°, parte a 12° allo scuro.

Giornalmente con l'ago di platino ne prelevava una piccola porzione che seminava in agar solidificato a becco di clarino e in brodo e poi quando queste colture rimanevano sterili proseguivo gli innesti nel brodo entro sacchetti di collodion che poi introducevo nel peritoneo di conigli ove li lasciavo per 4-5 giorni.

Ecco i risultati di due di questi esperimenti:

Numero degli esperimenti	Data in cui fu fatta l'emulsione dello stafilococco in glicerina	Data dell'innesto della emulsione nei substrati	Risultati	
			Sviluppo nei comuni terreni	Sviluppo nei sacchetti di collodion
1°	20 aprile 1905	20 aprile 1905	positivo	
		21 » »	id.	
		22 » »	negativo	positivo
		23 » »	—	id.
		24 » »	—	negativo
		25 » »	—	—
2°	17 maggio 1905	17 maggio 1905	positivo	—
		18 » »	id.	—
		19 » »	id.	—
		20 » »	id.	—
		21 » »	id.	—
		22 » »	id.	—
		23 » »	negativo	positivo
		24 » »	—	negativo

Risulta dunque dalle ricerche qui esposte che lo stafilococco si rese incoltivabile nei comuni terreni, lasciato nella glicerina diluita a metà con l'acqua, per 3-6 giorni, alla temperatura del termostato e nel brodo, contenuto dei sacchetti di collodion posti nel peritoneo dei conigli, dopo 4-7 giorni.

Quanto alla durata della coltivabilità dello stafilococco, dalle emulsioni in glicerina diluita tenute alla temperatura di 10°-12°, da una prova fatta, mi è risultato che dopo 21 giorni il germe era incoltivabile nei comuni terreni; ma lo fu ancora dopo 31 e dopo 48 nei sacchetti di collodion. Faccio però notare che le prove al 37° giorno erano riuscite, non so perchè, negative; ad ogni modo 3 innesti in sacchetti di collodion fatti al 53° diedero risultato del tutto negativo come quelli fatti al 48°.

Però, anche in questi casi non sempre si deve ritenere lo stafilococco morto nelle emulsioni da cui è incoltivabile anche nei sacchetti di collodion.

Difatti, inoculando nella cornea dei conigli una emulsione che conteneva il micrococco stato in glicerina per 55 giorni, l'ho ancora potuto isolare dal focolaio circoscritto della cheratite suppurata, che si era formata.

E' noto che si trattava realmente del micrococco ugualmente patogeno per i cani e non di uno dei soliti cocchi aurei patogeni.

La esperienza che mi condusse a questo risultato è la prima delle tre seguenti che riporto a maggiore intelligenza del lettore:

Numero degli esperimenti	Data in cui si è fatta l'emulsione	Risultati delle semine in sacchetti di collodion		Inoculazione endocorneale dell'emulsione	
		Data	Risultati	Data	Risultato
1°	7 maggio 1905	7 maggio 1905	positivo		
		8 »	»		
		9 »	negativo	9 maggio 1905	10 maggio 1905 - Opacamento di ogni punto inoculato: uno di essi è a contenuto fluttuante. Dal contenuto si isola il cocco aureo.
2°	9 maggio 1905	9 maggio 1905	positivo		
		10 »	»		
		11 »	»		
		12 »	»		
		13 »	negativo	13 maggio 1905	16 maggio 1905 - Opacamento diffuso a tutta la cornea: punti inoculati bianchicci. Non si isola il cocco da alcuno di essi.
3°	8 maggio 1905	8 maggio 1905	positivo		
		9 »	»		
		10 »	»		
		11 »	»		
		12 »	negativo		
		13 »	»		
		14 »	»		
		15 »	»		
		16 »	»		19 maggio 1905 - Come nel caso precedente, non si isola il cocco.

Se quindi dal pus vaccinico il micrococco aureo è, nelle condizioni ordinarie, incoltivabile ciò si deve all'azione della glicerina che per lo appunto lo rende incoltivabile, tanto più presto, quanto più la temperatura ambiente si avvicina a 37°.

***

Ciò premesso vediamo quali siano i caratteri di questo micrococco.

Li ho studiati completamente e nell'identico modo in tre stipiti e a questi sono andato paragonando gli altri.

Gli stipititi sono questi:

A. Isolato il 25 marzo 1903 da una pustola vaccinica di vitello a mezzo di colture in brodo di cute e in aerobiosi.

B. Isolato il 15 marzo 1905 da una coltura in brodo entro un sacchetto di collodion posto per 6 giorni nel peritoneo di un coniglio, di filtrato di un vaccino che aveva prodotto delle pustole sulla cute dei cani.

C. Isolato il 28 marzo 1905 da una coltura come la precedente di un filtrato di vaccino canino concentrato nel vuoto, vaccino che aveva provocato delle pustole innestato sulla cute dei cani.

I loro caratteri morfologici, i loro caratteri colturali, sono quelli degli stafilococchi piogeni aurei.

Anche il saggio del potere emotossico li avvicina, senz'altro a questi germi.

Il loro modo di comportarsi verso i comuni animali è il seguente:

Coll'inoculazione sottocutanea non si producono mai ascessi, nè nelle cavie, nè nei conigli, tutt'al più qualche po' di indurimento, che a lungo andare, se l'animale campa, si riassorbe.

Colla inoculazione endovenosa non evvi animale che sopravviva; le cavie e i conigli in poco più di un giorno muoiono, i cani in 3 giorni, raramente in 5.

All'autopsia si nota: cute con chiazze emorragiche; iperemia fortissima di tutti i visceri, un po' di liquido nel peritoneo, il fegato nerastro, la milza congesta, il rene con piccole emorragie sottocapsulari; il sangue del cuore nerastro e in gran parte liquido: cioè, si osservano tutte le note anatomiche di una tipica setticemia.

***

Frattanto, considerando la frequenza col quale il cocco si trova nel pus vaccinico e nei filtrati capaci di dare la pustolosi vaccinica, occorreva naturalmente di vedere se potesse mettersi in rapporto con le manifestazioni vacciniche pustolari.

Ricorderò qui che il Sanfelice ed il Malato ritennero esistesse un rapporto tra vaccino e materiale vaioloso, non solo, ma tra vaccino e colture del micrococco aureo da loro isolato dai vaiolosi, perchè i cani inoculati sulla cute con vaccino e poi nelle vene con lo stafilococco si salvavano.

Studiai quindi, prima di ogni altra cosa, il mio cocco nei suoi rapporti con l'infezione vaccinica a mezzo di prove immunizzanti, ripetendo la esperienza degli autori. I risultati furono identici.

Se nonchè per stabilire ben netto il rapporto tra vaccino e micrococco volli vedere se gli stessi risultati si avevano, da una parte, inoculando sulla cute il germe e poi, a guarigione della lesione cutanea, il micrococco nelle vene e dall'altra, a guarigione della lesione cutanea, prodotta dallo stafilococco, inoculando del virus vaccinico, sempre sulla cute.

Il cane sottoposto al primo esperimento sopravvisse; nel secondo cane la rivaccinazione (eseguita 13 giorni dall'innesto del cocco) con polpa vaccinica attecchì, senz'altro; anzi si ebbe una pustolosi fiorente.

Altri due cani così trattati per altre ricerche dopo 7 e dopo 33 giorni presentarono lo stesso, delle pustole rigogliosissime.

Bisognava quindi concludere che *se la vaccinazione dei cani, con polpa vaccinica, può salvare gli animali dall'inoculazione endovenosa dei micrococchi, l'inoculazione cutanea dei micrococchi non salva gli animali dalla eruzione pustolare che vi produce il virus vaccinico successivamente innestato.*

Del resto, per meglio risolvere la quistione feci ancora un'altra ricerca.

Se infatti, nei cani inoculati con stafilococco sulla cute e guariti dalla lesione cutanea si producevano pustole, coll'inoculazione di polpa vaccinica attiva, bisognava ammettere o che i cani vaccinati con lo stafilococco non si immunizzassero verso lo stafilococco stesso o non si immunizzassero verso il virus vaccinico.

Inoculai perciò un cane sulla cute scarificata con stafilococco e a lesione cutanea guarita ripetei l'inoculazione 1-2-3 volte a diversi intervalli di tempo.

Ecco gli esperimenti fatti:

2 giugno 1905. Si inocula sulla cute scarificata, di un cane una emulsione di stafilococco in glicerina diluita a metà in acqua, proveniente da una coltura in agar di 48 ore.

3 giugno. Arrossamento di tutti i punti scarificati e qua e là qualche punto coperto di pus.

5 giugno. Tutti i punti scarificati sono coperti di pus.

21 giugno. Si ripete l'inoculazione cutanea di stafilococco.

22 giugno. Si ottengono gli stessi risultati osservati in seguito alla prima inoculazione.

5 luglio. Si ripete l'inoculazione cutanea di stafilococco.

7 luglio. Tutti i punti sono arrossati: qua e là qualcuno è coperto di pus.

9 luglio. Permangono gli stessi fatti: il cane muore nella notte dal 9 al 10 luglio.

È chiaro quindi che *la vaccinazione praticata con il micrococco non immunizza contro successive vaccinazioni, sempre di micrococco, praticate dopo la guarigione della lesione cutanea 13-32 giorni l'una dall'altra.*

Conseguentemente non può recare meraviglia, se il vaccino inoculato sulla cute dei cani, dopo guarigione della lesione cutanea prodotta dal micrococco, abbia determinato la formazione di pustole e potrebbe anche spiegare perchè la *vaccinazione col micrococco aureo non immunizzi la cute verso il vaccino.*

L'esperimento seguente anzi lo dimostrerebbe.

A) *9 aprile 1905.* Si emulsiona una coltura sviluppatasi da 48 ore su agar e si inocula sulla cute scarificata di una cagna.

21 aprile. Tutti i punti innestati sono arrossati e rilevati: l'arrossamento però è diffuso. Una sola pustola a destra più in alto dell'inguine corrispondente.

B) *26 aprile.* Si inocula sulla cute un piccolo cane, metà con emulsione di stafilococco come sopra, e da 4 giorni in termostato a 37°, metà stata in contatto coi vapori di cloroformio, pure per 4 giorni.

28 aprile. Si trovano qua e là in ambedue le parti dell'addome crosticine gialliccie corrispondenti ai punti scarificati.

28 aprile. I punti coperti da crosticine confluiscono nella parte alta dell'addome: sembra di osservare un tratto di cute eczematosa.

9 maggio. Si vaccina il cane sulla cute con polpa vaccinica attiva per vedere se è immunizzato.

10 maggio. Tutti i punti scarificati sono arrossati e rilevati.

12 maggio. Evidenti pustole in tutti i punti scarificati che tendono a confluire.

17 maggio. Tutto l'addome è coperto da placche lardacee e qua e là si vede qualche pustola ombellicata.

È dunque evidente che il *cocco inoculato sulla cute dei cani produce una pustolosi cutanea la quale però non immunizza i cani dalla inoculazione di polpa vaccinica attiva.*

***

Precisato questo primo punto ne rimanevano però alcuni altri da risolvere e, cioè:

1° Quale era la lesione che poteva determinare inoculato sulla cute dei cani, il micrococco, in condizioni di diversa virulenza e coltivabilità e di incoltivabilità.

2° Quale era la lesione che il micrococco era capace di determinare ancora in diverse condizioni di virulenza e di coltivabilità sulla cornea dei conigli.

I. Patine sviluppatesi su agar a becco di clarino ho emulsionato in glicerina diluita a metà con acqua e da un canto ho innestata l'emulsione sulla cute scarificata di cani sani, dall'altra le ho innestate virulente e attenuate sulla cornea dei conigli.

***

Solo le colture virulente o appena attenuate hanno prodotto delle pustole sulla cute dei cani.

Considerando intanto attentamente i caratteri di tali lesioni e mettendole in rapporto con quelle che produce il vaccino, risultano evidenti dei dati che servono a differenziarle le une dalle altre, ciò che mi porta a dare ragione al Santori F., che vuole distinta la pustola vaccinica dalla pustola dirò così stafilococcica.

Metto in paragone i caratteri delle due lesioni, per maggiore chiarezza come li rilevò l'A.:

Caratteri peculiari della pustolosi	Pustolosi vaccinica	Pustolosi stafilococcica
Comparsa	Non prima di 2 giorni	Anche in 24 ore.
Evoluzione delle lesioni cutanee.	Le maculo-pustole diventano papulo-vescicole e pustole al 7°-8° giorno.	Le pustole sono già formate al 2°-3° giorno.
Carattere della parte centrale della pustola.	La parte centrale è infossata ...	La parte centrale è sollevata.
Contenuto della pustola.	Gialliccio, denso: lacerando in un punto la pustola, anche nei primi giorni, non si vuota completamente.	Gialliccio, liquido: lacerando la pustola, il suo contenuto si svuota completamente.
Fondo della pustola.	Svuotando la pustola, il fondo rimane sollevato.	Svuotando la pustola, il fondo rimane appiattito.
Decorso	Circa 20 giorni...............	Circa 10-12 giorni.

II. Ho eseguito esperimenti con emulsioni tenute in termostato a 37° o trattati col metodo del Green per la depurazione del vaccino. Ne riporto qualcuno.

A) *19 aprile 1905.* Si inocula nella cornea di un coniglio a mezzo di tasche endocorneali, un po' di cultura su agar di 24 ore.

21 aprile. I punti innestati sono fortemente opacati; il contenuto di essi è fluttuante; la cornea circostante è leggermente opacata.

B) *9 maggio 1905.* Si ripete la prova con il materiale emulsionato in glicerina diluita a metà con acqua distillata, rimasto per 3 giorni a 37°.

10 maggio. Opacamento dei punti inoculati a contenuto fluttuante; evidente cheratite suppurata.

C) *20 aprile 1905.* Si fa la prova colturale col materiale emulsionato in glicerina e tenuto in termostato a 37° per 4 giorni e poi lasciato a sè sino al 26 aprile, per vedere se in questo tempo l'innesto in un sacchetto di collodion contenente brodo rivelasse la presenza del germe ancora in condizioni di essere coltivabile.

26 aprile. Essendo rimasto sterile l'innesto nel sacchetto, si inocula la cornea di un coniglio.

29 aprile. Il coniglio muore senza che nell'occhio si osservi alcuna lesione, salvo un lieve opacamento corneale.

D) *20 aprile.* Si fa la prova colturale con il materiale emulsionato in glicerina diluita a metà con acqua ed esposto ai vapori di cloroformio per 6 ore.

25 aprile. La coltura fatta nei sacchetti di collodion essendo rimasta sterile si inocula l'emulsione nella cornea di un coniglio.

30 aprile. Si sono prodotti piccoli punti bianchi in corrispondenza dei tratti inoculati: la cornea circostante si presenta leggermente opacata.

Faccio qui notare che nelle cornee inoculate con micrococchi ancora virulenti è notevolissima l'infiltrazione leucocitaria, ma nelle cellule epiteliali non si scopre alcun *cytoryctes*; che in quelle inoculate con micrococchi incoltivabili nei comuni terreni si osservano pochi leucociti tra le cellule epiteliali e qualche rarissimo *cytoryctes*; e infine che nessun *cytoryctes* si ritrova quando l'inoculazione viene fatta con micrococchi incoltivabili anche nel brodo in sacchetti di collodion posti entro il peritoneo dei conigli. Invece tra cellula e cellula qua e là nella palizzata epiteliale, si trovano dei corpicciolì ovalari, rotondi o deformati, che si mettono bene in evidenza colorando col violetto di genziana e decolorando coll'acido ossalico, i quali alcune volte riproducono delle vere e proprie figure a rosetta: soltanto sono sempre extra cellulari. Indubbiamente essi sono i cocchi inoculati.

***

Anche senz'aggiungere altri fatti è chiaro che il micrococco isolato del vaccino, per il modo di comportarsi dal punto di vista immunitario, per le lesioni che determina sulla cute dei cani, non può considerarsi l'agente etiologico della infezione vaccinica.

Come però ho fatto rilevare non si può disconoscerne l'intervento nella fase pustolare della lesione vaccinica.

Il trovarlo costantemente nei pus, che producono le pustole o nel contenuto delle pustole o in molti filtrati che producono pu-

stolosi, è un fatto di una tale importanza da non potersi disconoscere (1).

Sta invero che io, dopo tante ricerche ed esperimenti fatti, non ho ancora incontrato alcuna lesione vaccinica nei cani nella fase pustolare, in cui sicuramente abbia potuto escludere l'intervento di questo piogeno.

Alcune esperienze che ora espongo mi pare precisino il significato di questo micrococco.

Queste esperienze sono distinguibili in due serie: le une dirette a studiare le lesioni che si producevano sulla cute dei cani con la inoculazione di stafilococco emulsionato in filtrato vaccinico assolutamente amicrobico e tutt'al più capace di dare luogo a papule nei punti scarificati; le altre dirette a studiare le lesioni che si producevano sulla cute scarificata di cani in precedenza inoculati sulla cute o nelle vene con lo stafilococco stesso e poi successivamente con vaccino filtrato, tutt'al più capace di dare luogo a papule nei controlli.

Ne riporto con qualche dettaglio qualcuna per esempio.

1ª serie di esperienze.

Controllo. — *7 marzo 1905.* Si inocula sulla cute di un cane vaccino Pavia filtrato attraverso una Berkefeld W ben triturato e diluito.

10 marzo. Alcuni punti scarificati sono arrossati e sollevati: nessuno tende a evolvere in pustola.

Esperimento. — *13 marzo 1905.* Si emulsiona lo stafilococco, da coltura in agar, in 5 cmc. del filtrato precedente e si inocula sulla cute scarificata di un cane nuovo.

15 marzo. I punti scarificati sono sollevati e arrossati e qualcuno già coperto di una crosticina.

17 marzo. Tutti i punti scarificati sono coperti di spesse croste di aspetto lardaceo difficilmente distaccabili.

---

(1) Faccio notare che a bella posta non parlo di avere praticato su questo cocco alcuna prova siero-diagnostica col siero dei cani con pustolosi vaccinica, prova alla quale avrei potuto ricorrere per vedere se quei filtrati, che producono pustolosi, contengano il cocco e anche per vedere, se questo venga agglutinato dal siero dei cani inoculati con diversi vaccini. E dico a *bella posta* perchè esperimenti fatti con il cocco inoculato sulla cute mi hanno condotto a trovare che il siero del cane non acquista proprietà agglutinanti verso di esso. E' invece facile trovarlo dotato di proprietà agglutinanti verso altri germi isolabili dalle pustole. Ciò spiega perchè Waele e Sugg (*Etude sur la variole et la vaccine.* Arch. intern. pharm. et thérapique, 1904), abbiano trovato il siero delle vitelle vaccinate e dei vaiolosi di Anversa agglutinanti gli streptococchi vaiolo-vaccinici e non gli stafilococchi del vaccino.

2ª serie di esperimenti.

A) *21 aprile 1905*. Si inocula sulla cute scarificata di un cane, il micrococco.

25 aprile. Si osserva qua e là qualche crosticina; ma la maggior parte dei punti scarificati sono guariti. Si inocula allora sempre sulla cute il filtrato del vaccino, di cui all'esperimento precedente.

29 aprile. Tutti i punti scarificati si presentano rilevati e fortemente arrossati.

31 aprile. Si osservano ovunque bellissime pustole di cui qualcuna delle più piccole, ombellicata: in alto sono confluenti e formano una crosta giallastra, spessa, aderente.

B) *9 maggio*. Si inocula vaccino Pavia accuratissimamente triturato e filtrato attraverso una Berkefeld W e trattato per 6 ore col metodo del Green.

11 maggio. Il liquido si inocula sulla cute scarificata di 2 cani, da 3 giorni inoculati nelle vene con lo stafilococco aureo.

12 maggio. Si osservano nei punti scarificati chiazze rosso-brune, su cui si elevano ***bellissime pustole ombellicate***, isolate le une dalle altre in un tratto di cute e ciò in ambedue i cani.

Le colture da qualcuna di queste pustole riescono tutte positive. Si trova anche il cocco nel sangue circolante.

13 maggio. Il 1° cane muore nella notte, il 2° in giornata.

Anche senza aggiungere altre parole, la importanza di questi esperimenti non può sfuggire ad alcuno: *è evidente infatti che la presenza dello stafilococco nei filtrati o, meglio, nei cani inoculati coi filtrati, permette di ottenere, coi filtrati che producono sole papule, delle pustole che sono indifferenziabili da quelle vacciniche.*

Sovratutto è di notevole interesse il risultato ottenuto nei cani inoculati nelle vene, nei quali si sono osservate le tipiche pustole ombellicate che si ritengono caratteristiche della infezione vaccinica.

***

Se però, con gli esperimenti ora esposti, fu agevole dimostrare nella pustolazione l'intervento del piogene in discorso, non fu altrettanto facile spiegare perchè certi filtrati, che offrono le migliori garanzie di sterilità e nei quali è assolutamente da escludere la presenza del micrococco, potessero determinare una pustulosi cutanea.

Numerosi sono stati i filtrati che ho trovati capaci di produrre delle pustole: però quelli che sotto questo riguardo mi hanno maggiormente interessato sono: i filtrati tenuti a 70°-80° per le prove sulla resistenza del virus e due filtrati trattati con i vapori di cloroformio col metodo di Green.

L'esame batteriologico del contenuto delle pustole ottenute con questi filtrati, esame praticato al loro primo comparire, riuscì costantemente positivo riguardo alla presenza del piogene.

Evidentemente solo due ipotesi erano possibili: o che il germe si trovasse sulla cute dei cani o che il virus vaccinico di per sè fosse capace di determinare delle vere pustole.

Per risolvere la quistione ho, quest'anno, ricercato il germe in discorso sulla cute e anche nel sangue dei cani.

E, perchè queste ricerche potessero subito condurmi a risultati degni di fede, ho cercato di seminare la cute bene suddivisa nei terreni di coltura. All'uopo ho raschiato tratti di cute dell'addome di cani e il materiale l'ho triturato con quarzo in mortaio di porcellana e diluito con brodo ordinario; ho quindi centrifugato e il liquido soprastante al deposito ancora torbido, l'ho seminato in tubi di altro brodo, che a loro volta ho diluito in altri brodi.

Delle varie diluizioni ho fatto innesti a piatto in agar, che ho posto in termostato a 37°.

Le colonie dei cocchi sviluppatesi, venivano isolate e subito sottoposte a uno studio comparativo con i tre micrococchi tipo.

Se risultavano identici si inoculavano nelle vene dei cani e poi successivamente si praticava l'innesto cutaneo di vaccino filtrato, del tutto amicrobico.

Orbene da 21 cani così esaminati, 9 volte fu isolato un cocco identico a quello isolato nel vaccino.

È dunque evidente che il germe si può trovare anche all'infuori del vaccino sulla cute dei cani.

Ciò che può spiegare la sua presenza nelle pustole vacciniche che si ottengono sulla cute dei cani con la inoculazione di vaccino filtrato, assolutamente amicrobico.

Forse estendendo le ricerche anche alla cute dei bovini e a quella dell'uomo si potrà venire ad analoghi risultati.

***

Intanto ammettendo l'intervento dei piogeni nella pustolazione vaccinica era naturale che dovesse prendersi in considerazione la possibilità che lo stesso fatto potesse avverarsi nella ulcerazione corneale.

Ho già fatto rilevare che il cocco di per sè nelle più diverse condizioni di virulenza e di coltivabilità era incapace di produrre il fenomeno guarneriano.

La quistione che si presentava ora da risolvere riguardava il

possibile intervento di esso nel produrre il detto fenomeno nelle cornee inoculate coi filtrati.

Servendomi di filtrato sterile, a cui ho aggiunto colture del micrococco, in diverse condizioni di virulenza e coltivabilità ho fatto alcuni innesti endocorneali nei conigli.

Questi però non hanno sortito un notevole risultato in riguardo al fenomeno microscopico guarneriano, perchè i *cytoryctes*, quando vennero osservati, nelle cornee inoculate con vaccino filtrato e micrococchi, erano così pochi, da non potersi mettere in confronto con quelli che produce la polpa vaccinica attiva.

Soltanto farò notare che, osservando macroscopicamente la lesione si vede attorno all'ulceretta, prodotta dai vaccini inquinati, un aloncino chiaro che ripete il tipico aloncino delle ulceri che si ottengono con la inoculazione di polpa vaccinica e che, a mio avviso, finchè esso si osserva dà la sicurezza della trasmissibilità della lesione da animale ad animale.

Questo aloncino manca nelle ulceri prodotte dall'inoculazione di filtrato non inquinato a meno che non si usino tecniche speciali (per es. tenere chiuse le palpebre), per la buona riuscita dell'esperimento, e in questo caso le ulceri sono anche trasmissibili in serie per un minor numero di animali.

L'intervento quindi dei piogeni, nella lesione vaccinica corneale tutto dà a credere manchi: certo se c'è, è assai meno netto che in quella cutanea.

***

Dopo di che sono venuto alle seguenti conclusioni:

1. Nei pus vaccinici che producono la pustolosi sulla cute dei cani si trova un micrococco aureo piogene, il quale nelle ordinarie condizioni in cui si trova il vaccino in commercio è incoltivabile; può divenirlo o innestando il virus nel brodo in sacchetti di collodion, che si pongono nel peritoneo dei conigli, o inoculando il pus nella cornea, ecc.

2. Questo micrococco non si differenzia dai comuni stafilococchi piogeni, per i caratteri morfologici e colturali: può trovarsi anche nella cute dei cani sani e risponde al tipo degli stafilococchi più ematossici.

3. Inoculato nelle vene dei cani li uccide: produce sulla cute delle chiazze emorragiche più o meno estese e, se la cute viene scarificata, delle pustole.

4. Tanto le pustole che si producono nei cani, inoculate nelle vene, quanto quelle che si producono sulla cute dei cani inoculati per scarificazione cutanea, sono però diverse da quelle vacciniche per decorso, durata, contenuto, fondo. Anche la lesione che produce nella cornea dei conigli non ha che vedere con quella guarneriana.

5. I rapporti, che, dal punto di vista immunitario, questi micrococchi sembrano avere con il vaccino sono semplicemente apparenti, perchè è ben vero che la vaccinazione cutanea dei cani li può salvare dalla inoculazione endovenosa del micrococco, ma analogamente si comporta la vaccinazione cutanea con lo stafilococco e d'altro canto tale vaccinazione non impedisce il buon esito della rivaccinazione con polpa vaccinica, anzi l'intensifica.

6. Di questo germe non si può però sconoscere l'intervento nella fase pustolare della lesione vaccinica cutanea: lo si trova nel pus delle pustole, in molti filtrati che dànno la pustolosi, e sulla cute degli animali.

7. Uguale importanza non gli si può riconoscere nella lesione corneale: solo si può dire che le ulceri da filtrati, che lo contengono sono circondate da un netto aloncino infiammatorio e sono più facilmente trasmissibili in serie di quelle prodotte dai filtrati non inquinati.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Studî sul vaccino

Esperimenti di vaccinazione con vaccino filtrato attraverso le Berkefeld W

per il prof. **O. CASAGRANDI.**

Tutte le ricerche da me fatte in questi ultimi anni sul vaccino mi conducevano ad ammettere con sicurezza:

1° la possibilità di ottenere del pus vaccinico attivo sulla cute dei cani e sulla cornea dei conigli, assolutamente privo di batteri, filtrandolo, previa accurata triturazione e diluizione in Na Cl al 0.85 per cento, attraverso le Berkefeld *W* e le Chamberland *F*;

2° la possibilità di ottenere l'immunizzazione dei cani con vaccini, che non producevano pustole sulla cute di questi animali, ma solo papule e a volte neppure queste.

Stando così le cose doveva necessariamente vedere come si comportasse verso l'uomo la vaccinazione a mezzo di vaccino filtrato. Data la possibilità del passaggio del virus attraverso le candele porose, sostituendo la vaccinazione coi filtrati, mi pareva dovesse conseguirne un notevole perfezionamento nella tecnica della preparazione del vaccino e un notevole progresso in quella della vaccinazione.

Sarebbe stato infatti possibile sostituire all'ordinaria polpa vaccinica, un liquido privo di batteri e di cellule e contenente soltanto l'agente dell'infezione. Nè dalle raccolte di vaccino si sarebbe ricavato minore quantità di materiale, ma assai di più, perchè si sarebbe potuto utilizzare anche la parte, che di solito residua nel cribro e d'altro canto si sarebbe potuto diluire il pus triturato assai più che non si faccia attualmente.

Le prime vaccinazioni fatte coi filtrati ottenuti da me attraverso le candele Berkefeld comuni nel 1903, eseguite accuratamente dal Santori F., non condussero a risultati confortanti. Il filtrato nulla produsse sulla cute dei bambini, e in questi dopo vario tempo, e precisamente 20-30 giorni, rivaccinati con polpa vaccinica ordinaria del vaccinogeno Leoni, si produssero tipiche pustole corrispondentemente ai punti scarificati. L'inoculazione del filtrato non aveva dunque immunizzato i bambini; nè l'esito negativo della vaccinazione col filtrato, dice il Santori, poteva addebitarsi ad una refrattarietà naturale dei bambini verso l'infezione.

Altre vaccinazioni eseguitemi per cortesia dal collega prof. Biagi, con vaccino del municipio di Roma filtrato, non produssero alcun fatto locale nei bambini, nè impedirono che questi rivaccinati con polpa vaccinica attiva, dopo 15 giorni, presentassero delle pustole nei punti scarificati.

Erano fin qui, però, esperimenti eseguiti con filtrati che non producevano nè papule, nè pustole sulla cute dei cani.

Volli quindi, appena se ne presentò l'occasione, ripeterli con filtrati capaci di produrre delle pustole sulla cute dei cani.

Nell'agosto del 1905, con un filtrato W, che mi ero portato a Catania da Cagliari fin dagli ultimi di luglio, e che era capace di produrre delle pustole sulla cute dei cani, ho inoculato per scarificazione la cute di un braccio di un bambino. Ma nulla si produsse localmente, mentre 21 giorni dopo rinoculato con vaccino di cavia, ho ottenuto pustole in ambedue i punti scarificati.

L'esito di questi esperimenti fu quindi identico a quelli eseguiti dal Santori e dal Biagi.

A tutti però si poteva muovere l'obbiezione, che non fosse sufficiente fare l'innesto col filtrato in 2 o 3 punti soltanto della cute, che fosse insomma troppo poco il virus inoculato.

Esperimenti con un vaccino concentrato nel vuoto avevo però già fatto, nell'aprile 1905, vaccinando un altro bambino con risultato del tutto negativo nel senso che rivaccinato con polpa vaccinica attiva, questa attecchì.

D'altro canto, il piccolo numero delle scarificazioni eseguite, da alcuni esperimenti sui cani, mi risultava non avere importanza. Le riferisco.

Un cane venne scarificato sulla cute dell'addome in 10 punti con un filtrato W che aveva prodotto delle papule e delle pustole sulla cute dell'addome di un cane sano, e un secondo cane con lo stesso filtrato venne scarificato in due punti soltanto.

Orbene, in tutti i punti scarificati già nella 3ª giornata si notava la formazione di papule, ma specialmente rigogliose nel secondo cane. Sette di esse nel primo cane divennero il 6º giorno delle pustole.

Guarite del tutte le lesioni, s'inocularono i due cani, sempre sulla cute, con vaccino del vaccinogeno di Pavia: in nessuno dei cani si formarono pustole.

La vaccinazione col filtrato W era dunque stato sufficiente ad immunizzarli, pure essendo stata fatta in soli due punti.

Del resto gli esperimenti eseguiti sull'uomo conducono a ritenere che una sola pustola è sufficiente a determinare l'immunità, purchè però la rivaccinazione non venga eseguita nei primi giorni dall'avvenuto innesto del pus vaccinico.

L'obbiezione da me mossa agli esperimenti fatti non aveva quindi quell'importanza che a tutta prima si supponeva.

***

Intanto, considerando il fatto ammesso da tanti, che senza la produzione della pustola non si può avere un'immunità nell' uomo, e tenendo presente alcuni esperimenti fatti da altri autori, i quali asportando il materiale pustolare man mano che si formava, riuscirono a non ottenere l'immunità nei bambini (Tedeschi), pensai che, dopo tutto, vaccinando coi filtrati l' uomo non mi ero messo in queste condizioni, poichè nessuno dei filtrati inoculati nell'uomo, si era dimostrato capace di produrre in esso delle pustole.

Ed allora, tornando sul concetto che già mi era formato, dell'intervento nell'etiologia della pustolosi dei piogeni, pensai di procedere a vaccinazioni con quei filtrati che risultassero contenere quel particolare microrganismo piogene aureo che, a mio avviso, è il più comune se non il solo germe che interviene a determinare la fase pustolare della lesione cutanea vaccinica.

Non volendo, per ragioni ovvie, eseguire una vaccinazione con filtrato vaccinico sterile, emulsionandovi del micrococco, sia pure reso incoltivabile, facendolo dimorare in glicerina alcuni giorni a 37°, mi riportai a un esperimento eseguito, tra gli altri, nel marzo 1905, esperimento che avevo considerato perduto per lo scopo per cui allora l'avevo eseguito, ma che per il presente risponde benissimo.

Esso è il seguente:

Il 10 marzo 1905 si precipita col siero del cane trattato con filtrato W di vaccino di Pavia, un filtrato dello stesso vaccino che aveva lasciato sterili i terreni di coltura.

Dopo 24 ore si forma un leggero deposito, che si solleva e intorbida il liquido smuovendo il tubo, tanto che occorrono 6 giorni ancora per ottenerlo depositato.

Il 17 marzo si decanta il liquido, si aggiunge al deposito qualche goccia di glicerina sterile e il 5 aprile si vaccina con esso un bambino.

Il 5 aprile appaiono già papule e il 7 aprile le pustole sono già sufficientemente sviluppate.

Frattanto io il 2 aprile procedeva a esami microscopici del liquido glicerico rimasto entro il tubo e con mia meraviglia notavo la presenza di numerosi e piccoli cocchi aventi lo stesso aspetto del solito cocco del vaccino.

Innestai subito il materiale in brodo in due sacchetti di collodion che tenni per 5 giorni nel peritoneo dei conigli. Dal contenuto di questi tubetti feci quindi passaggio in agar a becco di clarino e in brodo.

Ottenni, senz'altro, rigogliose colture del micrococco aureo, che mi fu facile identificare con quello ordinariamente esistente nel vaccino.

Intanto il 4 maggio il bambino veniva rivaccinato con polpa vaccinica attiva di Pavia, *ma questa volta con esito del tutto negativo.*

Dopo di che la conclusione da trarsi da questi esperimenti parrebbe questa, che *la immunità contro il vaccino si ha nell'uomo quando l'esito della prima vaccinazione è l'eruzione pustolare nei punti scarificati.* Questo, però, *finchè si riterrà che la pustola sia la lesione vaccinica;* ciò che a mio avviso non risponde ai risultati delle più recenti ricerche mie e di altri.

Anzitutto il fatto da me assodato e che ho riportato in principio di questo lavoro, che i cani si possono immunizzare per mezzo di filtrati che producono la sola papulosi e che anche non la producano, contraddice quello della necessità della formazione delle pustole per ottenere la immunità, tanto sostenuta dal Pfeiffer.

D'altro canto di recente il Kraus e Volk (Wien. Klin. Woch., n. 21) hanno fatto un esperimento oltremodo dimostrativo: hanno, cioè veduto che innestata la cute di scimmie con vaccino e asportata la parte della cute anche semplicemente arrossata. prima cioè che si formasse persino la papula, la pelle aveva acquistata l'immunità contro il vaccino. In altri termini hanno anche essi dimostrato che la formazione della pustola non è necessaria per la produzione della immunità. E questi AA. sono stati tanto sicuri dei loro risultati da pensare a utilizzarli in pratica, in modo da fare la vaccinazione senza produrre la pustola. Diluendo opportunamente la linfa avrebbero trovato che basterebbe inocularla sottocute per ottenere tale risultato, senza avere nè fenomeni generali nè fenomeni locali.

Gli esperimenti quindi eseguiti da me sui cani e da Kraus e Volk sulle scimmie condurrebbero, non v'ha dubbio, a ritenere che in questi

animali sia del tutto inutile, per avere l'immunità ottenere la pustolosi cutanea.

Però se dal cane e dalle scimmie vogliamo trasportare queste medesime conclusioni all'uomo, non si può con sicurezza affermare che i fatti decorrano nello stesso modo.

Certamente intanto, l'uomo di fronte al virus vaccinico bovino si diporta diversamente dal cane.

A suo tempo per rilevare che i cani inoculati con il liquido che si ottiene dal vaccino pressato, diluito con NaCl al 0.85 % in date diluizioni, non contraggono più l'infezione pustolare sulla cute, ma però possono ancora immunizzarsi.

Le medesime prove fatte sull'uomo con quelle diluizioni limiti di vaccino che immunizzano la cute dei cani, non immunizzano invece l'uomo. Queste prove sono state fatte dal Santori nel 1903 e da me riportate sommariamente: egli trovò che il diluito dalle proporzioni 1 : 50 in su, non produceva più pustole sul braccio dei bambini, nè li immunizzava contro una seconda vaccinazione fatta a 23 giorni di distanza dalla prima.

Quelle sui cani sono state fatte da me con diluito nei rapporti da 1 : 10 a 1 : 250. Il diluito 1 : 150 diede ancora delle pustole sulla cute dei cani.

Questi risultati messi assieme a quelli ottenuti coi filtrati che immunizzavano i cani e non l'uomo, mi fecero concludere che *il cane si diporterebbe di fronte all'inoculazione preventiva di vaccino filtrato o diluito diversamente dall'uomo: quei filtrati o quelle diluizioni che immunizzano il cane non immunizzano l'uomo.*

Del resto di fronte al vaccino non tutti gli animali si comportano ugualmente.

Anche i bovini per altri riguardi, di fronte all'immunità vaccinica si diportano diversamente dall'uomo.

Vi sono infatti autori, che affermano che la inoculazione sottocutanea di pus vaccinico bovino immunizza gli animali dall'inoculazione cutanea di vaccino, già dopo 48 ore, mentre l'uomo sia inoculato sottocute, con vaccino bovino, sia con vaccino immunizzato, non si immunizza anche se la vaccinazione cutanea si fa 15-21 giorni dopo la inoculazione nel sottocutaneo (Tedeschi).

I bovini alla loro volta si diporterebbero, sempre di fronte allo stesso vaccino bovino diversamente dal cane.

Il Waele e Sugg (1) sarebbero riusciti infatti a immunizzare i bovini introducendo sotto la pelle sacchetti di collodion della capa-

(1) *Sur la production de l'immunité par la méthode des sacs de collodion* (C. R. Soc. Biologie, 24 dicembre 1904).

cità di cmc. 0.3-0.5 contenenti vaccino sospeso nel brodo, tenendoli in sito per 3 giorni in un caso e per 7 in un altro, e si sarebbero accertati che gli animali erano immunizzati, perchè rivaccinandoli dopo 8 giorni l'uno e dopo 10 l'altro, l'esito della vaccinazione fu negativo.

Ripetendo io la stessa prova sopra un cane, tenendo nel suo sottocutaneo per 7 giorni due sacchetti di collodion, contenenti brodo con polpa vaccinica attiva e poi rivaccinando l'animale con la stessa polpa 10 giorni dopo, ho veduto svilupparsi nei punti inoculati delle pustole vacciniche (in 6 su 11).

Di guisa che volendo tradurre nella pratica la vaccinazione coi filtrati è necessario tenere anche presente che l'uomo di fronte all'immunità vaccinica si diporta diversamente dal cane e dai bovini, i quali in massima sono più ricettivi dell'uomo.

Conclusioni.

I filtrati di vaccino bovino che immunizzano i cani verso l'infezione vaccinica, sia che non producano alcun fatto locale, sia che producano anche delle pustole, non hanno provocato sulla cute del braccio dei bambini alcuna lesione e non hanno impedito, anche se usati concentrati nel vuoto e a bassa temperatura, il risultato positivo della rivaccinazione con vaccino non filtrato.

Si è potuto ottenere l'immunità verso l'infezione vaccinica cutanea con la polpa vaccinica non filtrata, inoculando filtrati vaccinici contenenti il micrococco piogene aureo che comunemente si trova nei vaccini.

Non è ammissibile che l'immunità vaccinica debba essere legata nell'uomo alla produzione di una vera pustolosi vaccinica, dal momento che i cani (Casagrandi) possono benissimo immunizzarsi coi filtrati, neppure capaci di produrre una pustolosi e che le scimmie (Kraus e Volk) sono già immunizzate quando si è prodotto semplice arrossamento della cute. Ciò non esclude, però, che, volendo mantenere come segno della conseguita immunità vaccinica, la pustolosi cutanea l'uomo, in riguardo all' immunità verso il vaccino bovino, si diporta diversamente dal cane e da bovini stessi: quei filtrati che immunizzano il cane non immunizzano l'uomo; le diluizioni limiti dei vaccini pressati che immunizzano il primo, non immunizzano il secondo: l'uomo non si immunizza coll'inoculazione sottocutanea di vaccino anche se umanizzato, mentre con questo metodo si immunizzano i bovini e le scimmie.

Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari

Sulla recidività alle infezioni

Prima serie di ricerche del prof. **O. CASAGRANDI.**

Non vi ha dubbio che, l'argomento della recidività alle diverse infezioni, non è nuovo e che già è stato sotto diversi punti di vista esaminato.

Però, volendo approfondire lo studio sino a ricercare l'intimo meccanismo dei fattori predisponenti, è facile accorgersi come manchino gli elementi su cui fondarsi, dacchè la maggior parte degli studiosi non hanno tentato delle indagini molto fini sul proposito.

In questo concetto, sono andato eseguendo le ricerche che espongo nel presente lavoro.

Dirò subito che, attesa la vastità dell'argomento, per potere con conoscenza di causa giungere a delle deduzioni di un certo interesse ho studiato per ora soltanto la recidività di una infezione protozoica, pur non trascurando di fare i necessari confronti con la recidività di altre infezioni da virus invisibili e da batteri.

L'infezione protozoica, a cui avrei voluto dare la preferenza sarebbe stata la malaria umana e particolarmente la quartana, la cui comparsa e la cui recidività è legata, a quanto pare, sempre a condizioni predisponenti: però attesa la difficoltà di sperimentare sull'uomo ho scelto l'infezione malarica degli uccelli di cui una forma mi era nota, da ricerche precedenti, recidivare anche dopo mesi di apparente guarigione.

***

Come è noto la malaria appartiene al gruppo delle infezioni, le quali recidivano con tanta costanza che, come dice giustamente il Celli, se le si dovesse dare ora un altro nome, dovrebbe denominarsi febbre recidivante.

La recidività della malaria è stata oggetto di varie ricerche in questi ultimi tempi, specie per cercare di scoprire le leggi che la regolano e i fattori che ad essa predispongono.

Si è così veduto che, se si prendono in esame le storie anamnestiche di tutti i malarici, le recidive appaiono legate a improvvisi raffreddamenti del corpo, a sforzi muscolari, a cambiamenti di clima, ecc.

Il Caccini le ha di recente assai bene analizzate e le ha trovate risiedere nella deficiente vittitazione, spesso in vittitazioni speciali (l'uso di pesche, di acque minerali, ecc.), nell'eccessivo lavoro, specialmente fisico (contadini), nei disturbi gastro-enterici, in seguito a crapule, ubbriachezza, in occasione di feste religiose, ecc., di matrimoni, in raffreddamenti del corpo specialmente freddo per pioggia, per una doccia e persino per un bagno di mare, in traumi, cadute o altro, in malattie intercorrenti, ecc.

Quando però dopo avere assodato l'esistenza di queste cause predisponenti alla malaria recidiva ci si voglia fare un concetto del suo meccanismo d'azione, mancano del tutto i dati su cui fondarci, sia nei riguardi della etiologia, sia che in quelli della patogenesi.

Infatti le ricerche che sono state fatte sulle forme parassitiche, le quali darebbero luogo alle recidive malariche, se hanno permesso allo Schaudinn di dimostrare l'esattezza dell'ipotesi del Grassi, che la recidiva della terzana lieve si debba alla moltiplicazione per partenogenesi dei gameti femminili, nessuna osservazione consimile è stata fatta per le altre due forme di malaria.

D'altro canto quegli autori che hanno cercato se questo particolare modo di moltiplicazione si verificasse nei gameti della febbre estivo-autunnale, come il Carducci, hanno dovuto concludere che nulla di simile a quanto lo Schaudinn ha descritto per la terzana lieve, si riesce ad osservare in essi.

Anzi il Carducci, attesi questi suoi risultati, è venuto nella supposizione che esistono altre forme pirogene di parassiti malarici, ancora ignote, che sarebbero quelle capaci di dare la recidiva.

Ma per quali ragioni o le forme indicate dallo Scaudinn o quelle supposte dal Carducci, in date condizioni vengano a moltiplicarsi e a dare la recidiva malarica, è ancora sconosciuto.

Stando così le cose, cercai di mettere in chiaro il meccanismo di alcune almeno delle cause predisponenti sopra accennate, alla malaria recidiva.

Non potendo, nè volendo in queste prime ricerche sperimentare sull'uomo, ricorsi agli animali. E poichè, *a priori*, gli uccelli si mostravano nelle migliori condizioni, ospitando due tipi di parassiti, di cui uno vicino a quello dell'uomo, il *Proteosoma*, l'altro, per quanto distante, però causa un'infezione a lungo recidivante, l'*Alteridio*, scelsi appunto questi animali per lo studio.

Anzi, data la facilità con la quale trovava piccioni affetti da alteridio, mi risolsi a studiare la questione della recidività della malaria alteridica nel piccione stesso.

Il piccione aveva del resto sugli altri uccelli il vantaggio di essere stato assai bene studiato nei suoi rapporti con le infezioni batteriche anche nel mio Istituto, per cui era anche possibile orientarsi *a priori* sulle modificazioni che in esso potevano portare gli agenti predisponenti i più diversi.

Riferisco quindi le mie ricerche sul meccanismo d'azione dei fattori determinanti le recidive nella malaria alterica dei piccioni.

Premetto che, stando agli studi dello Schaudinn sullo alteridio delle civette, l'infezione alteridica sarebbe una Tripanosomiasi: questo alteridio condurrebbe vita monogonica nel sangue della civetta, e sporogonica nella *Culex*. E durante la vita monogonica, come durante la vita sporogonica, le forme femminili avrebbero proprietà di moltiplicarsi anche per divisione partenogenetica.

Per l'alteridio dei piccioni non sono state fatte ricerche così dettagliate: però stando a quelle fatte da me e dal Barbagallo, esso non parrebbe identico all'alteridio delle civette. Certo però, esisterebbero delle forme capaci di dividersi per partenogenesi, dacchè la trasmissibilità della infezione alteridica si avrebbe dal piccione al passero inoculando sangue di piccione contenente le forme alteridiche, con i caratteri delle forme femminili, che sono quelle capaci di riprodursi per partenogenesi.

***

Vent'un piccioni rimasti dalle ricerche eseguite nell'estate del 1904, di cui 11 alteridici, esaminati ripetutamente nell'estate del 1905 si mostrarono del tutto privi di alteridi e 10 erano alteridici ancora nel luglio. Vennero quindi tenuti distinti gli uni dagli altri, e in tali condizioni da evitare le possibili punture delle *culex*, e sottoposti alle diverse cause predisponenti.

Partendo dalle acquisite cognizioni sulla refrattarietà dei piccioni alle infezioni carbonchiose, risultando da mie ricerche che questa può venir meno, quando si abbia una notevole diminuzione dei complementi, ho voluto provare, se anche nella predisposizione alla malaria recidiva questo fattore potesse avere influenza.

All'uopo sono ricorso alla tecnica già usata altra volta, che è quella seguìta dal Wassermann: cioè trattai ripetutamente le cavie con sangue di piccione: il siero così ottenuto riscaldato a 56°, si mostrava dotato di potere anticomplementare rispetto a quello del piccione: tre parti del siero anticomplementare riuscivano a neutralizzare una parte di siero fresco di cavia.

Le prove le facevo in questo modo:

Disponevo in vari tubi 1 cmc. di emulsione di sangue defibrinato di cavia (lavato) in cloruro sodico al 0.85 % (5 %).

Quindi in alcuni versavo da 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 cmc. di siero anticomplementare e poi dopo 1 cmc. di siero di piccione sano, ed in altri versavo semplicemente il siero del piccione sano.

Nei tubi aggiunti di siero anticomplementare, in cui non si avverava l'emolisi, giudicava che la quantità di siero anticomplementare avesse ostacolata l'azione emolitica del cmc. del siero di piccione.

E poichè dalle mie ricerche sulla recettività verso il carbonchio, dei colombi tenuti a digiuno, risultava che bastava inoculare a questi animali, già inoculati di carbonchio e sopravvissuti all'infezione, piccole quantità di siero anticomplementare (cmc. 0.25-0.50) per vederli morire tutti, senza alcuna eccezione di carbonchio, così ho praticate due ricerche: l'una sopra un colombo tenuto a digiuno e poi successivamente inoculato con siero anticomplementare; e l'altro sopra un colombo tenuto a pasto ordinario e poi successivamente inoculato di siero anticomplementare, usando quantità di questo ultimo precisamente dapprima di cmc. 0.25-0.50 per ogni animale, e poi via via crescenti sino a raggiungere la quantità di 5 cmc. e più per ciascuno.

Il primo è stato così inoculato con 5 cmc. di siero anticomplementare in 5 giorni e il secondo con 5.25 nello stesso periodo di tempo.

Esaminatone il sangue a giorni alterni, mai si presentò alcuna forma alteridica: però nel primo colombo trovai dei leucociti con granuli, che mi parvero di pigmento.

Ciò mi indusse a insistere in dette esperienze.

Perciò le ripetei in altri due piccioni, dei quali uno tenni a digiuno per 6 giorni, e l'altro inoculai anche con siero anticomplementare (3 cmc.).

Dei due piccioni il secondo non presentò alcun alteridio nel sangue: il primo invece tenuto semplicemente a digiuno al quarto giorno mostrò tale reperto scarso ma evidentissimo.

Bisognava quindi concludere che *il digiuno solo può predisporre alla recidiva alteridica e che la diminuzione dei complementi non ha alcuna importanza.*

Però la seconda parte della conclusione meritava di essere meglio precisata.

Da recenti ricerche eseguite nel mio Istituto risultava che, allorchè si sottopongono i colombi al digiuno, al salasso, al caldo, al freddo, ecc., diminuiscono le proprietà emolitiche che il siero di colombo esercita sulle emazie degli altri animali.

Uno dei primi colombi sopravvissuti, sottoposi quindi a questi diversi procedimenti e un altro lasciai digiunare per tre giorni e anch'esso sottoposi alle stesse prove.

Ebbene, dei due colombi, ancora una volta, solo il secondo mostrò forme alteridiche nel sangue e anche discretamente numerose.

Ciò che mi portò alla conclusione che *la diminuzione delle proprietà emolitiche del sangue, ove non sia accompagnata dal digiuno. non agisce come fattore predisponente alla recidiva alteridica.*

***

Stando così le cose pensai di procedere ad alcune ricerche sui colombi tenuti a digiuno in base ai risultati cui mi avevano condotto le indagini sulle sostanze dotate di azione emolitica nella malaria umana.

Avevo infatti potuto assodare che nell'accesso malarico umano si trovano nel siero delle sostanze estraibili coll'alcool, resistenti alle temperature di 100°, che sono dotate di proprietà autolitiche, sostanze che non esisterebbero, secondo le mie ricerche e quelle dell'Ibba, eseguite nel mio Istituto (in tutto una quarantina di individui) nel sangue dell'uomo sano.

Conveniva ora, nei colombi alteridici, vedere se il momento etiologico della recidiva rispondesse alla presenza in circolo e particolarmente nel siero, di tali sostanze.

L'Ibba, sempre nel mio Istituto, eseguiva all'uopo una serie di ricerche sul sangue privato del siero, e riusciva a trovare che dette sostanze si possono estrarre dal coagulo del sangue dei colombi sani e che sono dotate di azione battericida verso il b. del carbonchio e che subiscono brevi modificazioni nei colombi che si sottopongono all'azione di agenti predisponenti.

Io ne ricercai la presenza nel siero dei colombi sani e dei colombi tenuti a digiuno e venni alla conclusione che essi si possono estrarre dal siero stesso, soltanto in determinate circostanze, e precisamente:

1. Nei colombi tenuti a digiuno non meno di 4 giorni.
2. Nei colombi tenuti a bassa temperatura per varie ore, e poi al caldo e all'umido.
3. Nei colombi sottoposti ad iperalimentazione e salassati varie volte.

La loro maggiore quantità, dedotta dall'intensità dell'azione emolitica, si ha però nel digiuno.

Attesi questi risultati praticai i seguenti esperimenti:

1° Colombo, alteridico 4 mesi prima: peso gm. 300. Si sottopone a digiuno per la durata di 4 giorni; si salassa al 4° giorno e contemporaneamente si fa l'esame del sangue che ricsce positivo. Si separa il siero dal coagulo, si procede alla estrazione alcoolica di gm. 1 di siero secco e di gm. 2.75 di coagulo essiccato, polverizzato e lavato con cloruro sodico.

I due estratti si emulsionano in cloruro sodico al 0.85 %, e in quantità uguale al volume del sangue salassato.

Si trovarono ambedue le emulsioni dotate di azione autolitica.

2° Colombo, mai stato alteridico: peso gm. 290. Si sottopone alla azione del digiuno per 4 giorni. Si esamina il sangue e non lo si trova infetto. Si salassa e si sottopone siero e coagulo all'estrazione alcoolica. L'estratto alcoolico si emulsiona, come al solito, in cloruro sodico e si saggia il potere autolitico delle due emulsioni.

Si trova solo l'estratto alcoolico del coagulo dotato di questo potere.

3° Colombo; peso gm. 310: nelle stesse condizioni del precedente: anch'esso presenta *il solo estratto del coagulo dotato di azione autolitica.*

4° Colombo; peso gm. 280: nelle stesse condizioni del precedente.

5° Colombo; peso gm. 270: alteridico fino a circa un mese prima. Si salassa, si raccolgono gm. 0.55 di siero secco e gm. 0.65 di coagulo.

L'estratto alcoolico dei due materiali emulsionato, in cloruro sodico, si saggia nel suo potere autolitico: *se ne mostra fornito soltanto l'estratto del coagulo.*

L'animale si lascia a sè per altri 12 giorni, durante i quali gli si esamina sempre il sangue.

Il 12° giorno si inizia il digiuno: e si continuano gli esami microscopici del sangue.

Al 15° giorno si trova una forma alteridica.

Si salassa allora, si fanno gli estratti alcoolici del siero e del coagulo e se ne saggia l'azione autolitica. *Questa si trova in ambedue gli estratti.*

Parmi quindi che si possa concludere che *il momento in cui il digiuno agisce come predisponente alla recidiva alteridica, corrisponde a quello in cui nel siero passano le sostanze alcool-solubili coctostabili autolitiche, che nelle condizioni ordinarie si estraggono soltanto dal coagulo sanguigno.*

***

Rimanendomi ancora due colombi stati alteridici, l'uno 2 mesi prima, l'altro 4, ho voluto sperimentare se analogamente si comportassero altri 2 agenti predisponenti, e precisamente i ripetuti salassi e la prolungata azione del caldo umido.

Riferisco questi due esperimenti:

1° Colombo del peso di gr. 290. Si tiene per 4 giorni di seguito per 2 ore al giorno alla temperatura di 40°. Tutte le volte che si pratica l'esperimento si alimenta copiosamente l'animale, prima dello esperimento stesso.

Terminata l'azione del caldo si pone l'animale colle zampe nell'acqua alla temperatura di 10° per altre due ore.

Durante i 4 giorni si praticano ripetuti esami microscopici, che riescono del tutto negativi.

Al 40° giorno si salassa il colombo, si fanno gli estratti alcoolici del siero e del coagulo e se ne saggia il potere autolitico.

Si trova anche *l'estratto del siero dotato di un leggero potere autolitico.*

Si ripete allora l'esame microscopico, essendo l'animale sopravvissuto, al 6° e al 7° giorno: *si ritrova il colombo alteridico.*

2° Colombo peso gr. 270. Si alimenta come nelle condizioni ordinarie e si salassa ogni 3 giorni. Giornalmente si esamina il sangue. Il giorno dopo il 5° salasso è sofferentissimo: l'esame del sangue non rivela alcun alteridio.

Prima che muoia, lo si dissangua. Siero e coagulo ricavati dai diversi salassi si estraggono con alcool e si saggia il potere autolitico dei varî estratti.

Se ne trova costantemente fornito solo l'estratto del coagulo.

Anche all'autopsia l'esame del sangue dei varî visceri non rivela alcun alteridio.

Benchè gli esperimenti siano assai pochi, tuttavia in quei colombi, nei quali si hanno le recidive alteridiche, sottoposti all'azione di agenti predisponenti fisici, il momento in cui si ha la recidiva risponde a quello in cui dal siero si possano estrarre delle sostanze alcool-solubili autolitiche.

Parrebbe dunque che si dovesse concludere che *le cause, le quali spiegano la loro azione nel far recidivare la malaria alteridica, agiscono preferibilmente sulle emazie, alle quali fanno cedere al siero quelle sostanze alcool-solubili che ordinariamente posseggono.*

Io non ho indagato ulteriormente il fenomeno.

Certo però questi esperimenti fanno ricadere sulle emazie stesse le condizioni necessarie per la recidività della infezione.

I recenti lavori sul contenuto delle emazie, particolarmente sui lipoidi, non possono che avvalorare questo concetto, sul quale dalla malaria degli uccelli passando a quella dell'uomo, a suo tempo ritornerò.

***

Piuttosto, ora, ho cercato di studiare, se, in altre infezioni recidive non protozoiche, si verificassero i medesimi fatti.

Ho scelto anzitutto l'infezione vaccinica, alla quale i giovani cani sono molto recettivi e ho voluto vedere se, sottoponendo questi animali, stati infetti da vario tempo (1-23 mesi) all'azione delle medesime cause predisponenti, essi potessero contrarre di nuovo la infezione vaccinica. Inoltre ho cercato, nel caso la contraessero, se nel siero si trovassero le sostanze più sopra ricordate.

Mai però mi è riuscito nel termine di 1 a 23 mesi, di ottenere positiva la rivaccinazione degli animali, anche se sottoposti a digiuno molto prolungato.

D'altro canto ho bensì assodato che l'alimentazione maidica può far perdere la immunità vaccinale ai cani, ma in questi animali non ho trovato ii noto rapporto esistente nella recidività alla infezione alteridica.

Quanto alle infezioni alteridiche, ho fatto alcune ricerche su quella carbonchiosa nei cani, scegliendo quegli animali, che di fronte ad una prima inoculazione del virus, reagiscono con fenomeni generali, prostrazione, temperatura elevata e poi si rimettono.

Anche questi, sottoposti al digiuno non vengono colpiti dalla infezione carbonchiosa, mentre invece si può dire, senza eccezione, che anche dopo un mese dall'inoculazione tutti soccombono, inoculando ad essi del siero riscaldato di coniglio, ottenuto dopo ripetute inoculazioni di sangue di cane, siero che è dotato di forti proprietà tossiche verso i cani stessi (inoculato in una certa dose i cani diventano ittero-emoglobinurici).

In questi casi l'estratto alcoolico del siero è anch'esso dotato di un certo potere autolitico: però questo non pare legato al momento in cui scoppia l'infezione, perchè s'osserva anche nei cani, i quali non mostrano di infettarsi: viceversa, nel momento in cui l'animale va soggetto alla infezione carbonchiosa, ho notato costantemente riuscire negativa la reazione di fissazione, la quale col siero di cane sano e ancora con quello tenuto a digiuno, si ha sempre positiva.

Del resto non voglio qui insistere oltre su questi particolari, perchè è mia intenzione di estenderli e di farne oggetto di una seconda serie di ricerche.

Conclusioni.

1. I fattori che predispongono al recidivare delle infezioni non pare agiscano tutti nell'identico modo.

2. Nei riguardi dell'infezione malarica alteridica degli uccelli il fattore predisponente, *digiuno*, ha una importanza indiscutibile e si può stabilire che il momento in cui avviene la recidiva, risponde a quello in cui nel siero si trovano le sostanze estraibili coll'alcool, dotate di azione emolitica, che nelle condizioni normali si estraggono dal solo coagulo: anche altri fattori predisponenti alla infezione alteridica agiscono nello stesso modo.

3. Nei riguardi di altre infezioni, quale la vaccinica e la car-

bonchiosa nei cani, i medesimi fattori predisponenti alla infezione alteridica non spiegano un'azione recidivante: la recidività all'infezione vaccinica, si è ottenuta solo in seguito a particolare alimentazione (maidica) e quella all'infezione carbonchiosa in seguito alla inoculazione di siero di animali trattati con sangue di cane. Nell'una e nell'altra il rapporto tra recidività e presenza di particolari sostanze nel siero, è venuta a mancare. Allo scoppio della infezione carbonchiosa ha risposto la mancanza di sostanze fissatrici nel siero.

Istituto d'Igiene della Università di Roma

Ricerche ematologiche in alcune tripanosomiasi sperimentali

per il dott. M. LEVI DELLA VIDA, assistente,

e dott. CARLO VERDOZZI.

Introduzione - Argomento delle nostre ricerche.

Oltre che in alcuni stati morbosi dei quali è segno principale la alterata costituzione morfologica del sangue (anemie e leucemie), anche in tutte le condizioni anormali dell'organismo e delle più svariate affezioni morbose di natura infettiva o tossica, naturali e sperimentalmente provocate, ha assunto una immensa importanza la ricerca dettagliata di alterazioni quantitative e qualitative degli elementi figurati del sangue. Lo studio delle leucocitosi e delle leucopenie, della formula leucocitaria, di alterazioni morfologiche speciali dei globuli rossi e dei globuli bianchi, sono prezioso sussidio diagnostico e prognostico in molte malattie.

Si sono occupati delle variazioni numeriche dei leucociti durante la gravidanza, il parto ed il puerperio, e nelle malattie ginecologiche, fra gli altri Dutzmann, Carton, Neumann, Pankow, ecc.; nel tifo Giudiceandrea, Rogers, Higley, Love, e, sperimentalmente con iniezioni di tossina tifica, Azzurrini e Massari. Nella polmonite e nella broncopolmonite è stato studiato il variare del numero e del rapporto dei leucociti corrispondentemente alle fasi dalla malattia (Williamson, Figenschau, Heimann): e così pure nei difterici trattati con siero antitossico (Simon, Paris), e nelle intossicazioni difteriche sperimentali in animali normali e splenectomizzati (Nicolas Froment e Dumoulin), nelle angine non difteriche (Lortat-Jacob), nella parotite (Krestnikoff), nel vaiuolo (Ferguson, Magroth Brinckerhoff e Bancroft), nel carcinoma (Arneth), nel colera (Rogers), nella febbre di Malta (Axisa), nella sifilide (Bosc), nella rabbia clinica e sperimentale (Courmont e Lesieur); così pure nelle inoculazioni di rabbia e di vaccino si è fatto il paragone

del comportamento dei leucociti in conigli normali e splenectomizzati (Nicolas Froment e Dumoulin). Si è studiato il numero dei leucociti e la formula leucocitaria nelle intossicazioni sperimentali con varie tossine batteriche (Zielberger e Zeliony, Allaria), con atropina (Doyon e Billet), con albumine eterogenee (Hamburger e Reuss), con colina (Werner e Lichtemberg), nell'uremia sperimentale (Dopter e Gourand), ecc.

Notevole importanza ha la presenza o l'aumento di alcune cellule bianche: così va ricordata la Mastzellen-leucocitosi, in vero assai rara, ma pur talvolta osservata ed anche sperimentalmente riprodotta [Levaditi, Koenen, Schmauch, Bibergeil, Wolff, Pröscher (1)]; la presenza nel sangue di mielociti eosinofili in due casi di peste (Zinno), nella lebbra (Alezais), in un caso di dermatite polimorfa (Bloch e Aubertin); e la eosinofilia che è caratteristica di alcune infezioni come dell'anchilostomiasi (Boycott, Liermberger, Bruns Hayo Liefermann e Mäckel, ecc.), della filariosi (Wurtz e Clerc, Calvert), della trichinosi (Braun, Schleiss (2), Staübli, ecc.), della bilarziosi [Coles, Balfour, Kantiky-bey (3)], e che è stata osservata anche nella dissenteria da amebe (Billet), nella dermatite da mercurio (Hoffmann), ecc.; e riprodotta sperimentalmente da Pröscher con l'inoculazione di estratto di Taenia sagginata. Recentemente poi Arneth in una serie di memorie ed in una lunga monografia mette in rilievo delle differenze fra i leucociti polinucleati neutrofili, che gli permettono di individualizzarne varie categorie; egli dà importanza al predominio dell'una o dell'altra categoria nelle affezioni morbose, specialmente per ciò che riguarda il giudizio prognostico. Queste vedute di Arneth però non sono state accettate da tutti gli autori (Hiller), e vi è anche chi usando una tecnica diversa non ha potuto confermarne neppure i dati di fatto (Pollitzer).

L'esame ematologico poi assurge ad una importanza capitale in quelle malattie che riconoscono la loro origine in parassiti del sangue; in questi casi è però più che negli altri necessario, per fare uno studio completo, seguire sistematicamente le alterazioni qualitative e quantitative dei globuli rossi e dei leucociti in rapporto con le fasi della malattia.

Nella infezione malarica, dal 1876 ad oggi, si sono moltiplicati gli studi sulla diminuzione e le alterazioni degli eritrociti e sulle variazioni numeriche assolute e relative dei globuli bianchi (Kelsch, Dionisi, Bastianelli, Marchiafava e Bignami, Vincent, Melland, Delany, Poech, Rogers, Ciuffini, ecc.). E' noto che l'alterazione dei globuli bianchi sulla quale maggiormente è stata richiamata l'attenzione e alla quale si dà importanza diagnostica è l'aumento dei grandi mononucleati ed è stata segnalata inoltre da alcuni ricercatori la presenza di mielociti nel sangue circolante. Di più gli autori si sono occupati di seguire durante i vari stadi dell'accesso febbrile e durante le intermittenze il comportarsi delle varie specie di leuco-

---

(1) Cit. in LEVADITI. *Les nouvelles recherches*, ecc.
(2) Id.
(3) Id.

citi, e sono venuti così a stabilire con grande precisione il rapporto fra il predominio dell'una o dell'altra forma e i vari momenti dell'infezione.

Poche sono le osservazioni nelle piroplasmosi: già Smith e Kilborne avevano rilevato nella febbre del Texas la distruzione degli eritrociti e la rigenerazione di essi nei casi terminati in guarigione; avevano inoltre notato la presenza di globuli rossi contenenti granulazioni basofile. Gli autori successivi si sono limitati a costatare nella emoglobinuria dei bovini e nella piroplasmosi delle pecore una forte diminuzione numerica dei globuli rossi e spesso presenza di eritrociti policromatofili e punteggiati. Nuttal nella piroplasmosi del cane osserva nella forma acuta riduzione degli eritrociti da 6-7 milioni a 2 milioni, e intensa leucocitosi (fino a 40,000 leucociti per mmc.), con prevalenza dei polinucleati. Nella forma cronica è ancora maggiore la diminuzione dei globuli rossi (1,200,000 per mmc.) e l'aumento dei leucociti (fino 54,000 per mmc.). Nella *spotted fever* delle Montagne Rocciose (una piroplamosi umana che da molti autori è però ancora messa in dubbio) Anderson avrebbe constatato, accanto ad una notevole diminuzione delle emazie, un aumento dei globuli bianchi.

Nella febbre da zecche dell'Uganda, causata, come è noto, da una spirochete molto simile a quella del tifo ricorrente, è stato studiato recentemente il comportamento degli elementi figurati del sangue da Ph. Ross. Nella malattia spontanea l'autore osserva discreto aumento dei leucociti polimorfo-nucleati e un certo aumento anche dei mononucleati grandi, non paragonabile però a quello che si ha nella malaria. Nelle scimmie sperimentalmente infettate l'autore ha osservato la comparsa di una discreta leucocitosi dopo la inoculazione: i polinucleati aumentano specialmente con l'apparire delle spirocheti e la polinucleosi si continua fino alla crisi, dopo la quale si ha una inversione della formula leucocitaria, con prevalenza cioè dei linfociti. Si osservano durante la malattia fagocitosi nel sangue periferico per parte dei polinucleati e dei grandi mononucleati.

Nelle infezioni spontanee da tripanosomi si devono ricordare anzitutto le osservazioni sulla malattia del sonno. Già nel primo rapporto della scuola tropicale di Liverpool sulla spedizione per la tripanosomiasi in Senegambia, Annett riporta le ricerche ematologiche fatte su due europei e su quattro indigeni affetti dalla malattia del sonno. In complesso si osserva discreta leucocitosi, con grande aumento (dal 44 al 70 %) delle cellule mononucleate (linfociti e mononucleati grandi), eosinofilia, spesso aumento delle mastzellen. Nel numero VI dei rapporti della Commissione per lo studio della malattia del sonno, Greig e Gray riportano le osservazioni fatte su 57 casi di indigeni dell'Uganda. In tutti i casi vi è linfocitosi: aumento del numero totale dei leucociti si ha soltanto in 29 casi: eosinofilia in 34, con un massimo in un caso del 34 % di eosinofili. Però una obbiezione che si può fare a queste osservazioni è basata sul fatto di trovare facilmente associate alla tripanosomiasi altre condizioni patologiche, le quali determinino per conto loro una leucocitosi od una eosinofilia.

Si può rispondere a questa obbiezione coi risultati delle infezioni sperimentali: ma finora pochissime osservazioni si hanno sulla ematologia nelle tripanosomiasi sperimentalmente procurate. Nel classico trattato di Laveran e Mesnil, a proposito delle singole infezioni da tripanosomi, si trovano solo pochi accenni, i quali si riferiscono in genere alla diminu-

zione quantitativa degli eritrociti, all'aumento dei linfociti: talvolta si fa menzione di leucocitosi.

In due recenti lavori, Nissle si è occupato delle alterazioni morfologiche del sangue nelle infezioni da *Tryp. Brucei*, *Tryp. equinum* e *Tryp. Lewisii*, L'A. ha riscontrato la presenza di eritrociti policromatofili e di globuli rossi contenenti speciali corpi cromofili; ha osservato inoltre delle brusche cadute dei globuli rossi, che egli mette in rapporto con le diminuzioni, spontanee o conseguenti a somministrazione di sostanze medicamentose, del numero dei tripanosomi.

Nel novembre dello scorso anno, dopo che noi già avevamo intrapreso questo studio, Jakimoff ha riferito alla Società microbiologica di Pietroburgo alcune ricerche sul comportamento dei globuli bianchi e degli eritrociti in animali da laboratorio sperimentalmente infettati col *Tryp. Brucei* e col *Tryp. equinum*. L'A. distingue nelle malattie sperimentali tre periodi: nel primo si ha un aumento assoluto dei corpuscoli bianchi con diminuzione dei linfociti; gli eritrociti e l'emoglobina diminuiscono e non parallelamente. Il secondo periodo, che incomincia con la comparsa dei tripanosomi del sangue, è caratterizzato da febbre intermittente, in cui le elevazioni corrispondono ad un aumento del numero di tripanosomi circolanti. La curva della temperatura corrisponde alla curva del numero dei leucociti; però in complesso il numero dei leucociti va diminuendo. In questo periodo vi è aumento dei linfociti, diminuzione dei polinucleati. Nel terzo periodo, che comprende alcuni giorni prima della morte, si ha leucocitosi con polinucleosi; il numero dei linfociti diviene sempre più piccolo; si abbassa il numero dei globuli rossi e la quantità di emoglobina.

Le nostre osservazioni sono state dirette a ricercare quali fossero le variazioni totali dei globuli rossi e dei leucociti, e quale fosse la formula leucocitaria negli animali infettati con varie specie di tripanosomi; e (poichè nelle tripanosomiasi il reperto parassitario presenta delle notevoli oscillazioni fra un giorno e l'altro) quale il rapporto fra le variazioni ed il reperto parassitario. Gli animali sottoposti all'osservazione furono il cane, il coniglio e la cavia. ed alcuni sono stati inoculati con il *Tryp. Brucei*, agente etiologico del Nagana; altri con il *Tryp. equinum*, causa del Mal de Caderas degli equini dell'America del Sud; altri finalmente con il *Tryp. Gambiense*, che dà nell'uomo la malattia del sonno.

Tecnica adoperata.

Le inoculazioni sono state fatte nella cavità peritoneale, con sangue di altri animali contenente tripanosomi vivi, diluito nella soluzione di Laveran (citrato sodico e cloruro sodico ana 0,50 %). Fra tutti gli animali inoculati, una sola cavia è sfuggita all'infezione; gli altri, dopo un periodo d'incubazione di varia durata, hanno presentato tripanosomi nel sangue.

Il numero totale dei globuli rossi e bianchi è stato determinato con le conte ripetute a brevi intervalli di tempo e spesso ogni giorno. Il sangue era prelevato con la puntura di una vena dell'orecchio. Non è stato possibile fare le conte molto frequenti nelle cavie, perchè dopo poche prese di sangue non si riesce più ad ottenerne una quantità sufficiente per la facile trombosi delle poche e piccole vene dell'orecchio. Per quanto è stato possibile, le conte sono state fatte tutti i giorni alla stessa ora. E' nota infatti l'importanza non soltanto dei pasti, ma anche dell'ora (Birnbaum), sul numero totale dei leucociti. Per i globuli rossi abbiamo usato l'emocitometro di Thomas-Zeiss, per i leucociti la celletta di Elzholz. La diluizione del sangue per la conta dei globuli bianchi è stata fatta in soluzione di acido acetico al 0.33 %; per i globuli rossi, alla soluzione ipertonica di cloruro sodico comunemente usata, abbiamo sostituito una soluzione di citrato sodico e cloruro sodico al 0.5 %; e ciò perchè è occorso talora di osservare che la conta era resa difficile e perfino impossibile dalla formazione di accumuli di globuli rossi. Questa osservazione trova riscontro nell'autoagglutinazione delle emazie veduta da Thomas e Breuil sia nell'uomo malato di malattia del sonno, sia negli animali sperimentalmente infettati con il *Tryp. Gambiense:* e, secondo gli AA., questo fatto si ripeterebbe abbastanza di frequente nelle varie tripanosomiasi. Sostituendo la soluzione suddetta citro-cloro-sodica a quella di cloruro sodico al 3 %, siamo riusciti quasi sempre ad impedire la agglutinazione degli eritrociti.

Per ciò che riguarda il numero dei globuli rossi e dei bianchi e la formula leucocitaria che si osservano in condizioni normali negli animali da laboratorio, abbiamo tenuto conto delle cifre riportate nel trattato di ematologia di Bésançon e Labbé e nelle memorie speciali (Hirschfeld per cane, cavia e coniglio; Burnett per la cavia, Brinckerhoff e Tygger per il coniglio). Però abbiamo veduto che era necessario di determinare per ogni animale la formula emoleucocitaria in condizioni fisiologiche prima di sottoporlo alla inoculazione dell'agente infettivo; sia nei cani, sia nelle cavie, sia nei conigli, quando si tratta di animali sani e adulti, la cifra di globuli rossi per ogni specie animale varia entro limiti relativamente ristretti: per esempio, per il cane la cifra massima trovata è stata di globuli rossi 6,700,000 in un mmc., la minima di 4,600,000. Invece il numero dei globuli bianchi varia moltissimo da animale ad animale; talvolta nel cane è di 21,000 per mmc., tal'altra appena di 6000.

Contemporaneamente alla conta dei globuli rossi abbiamo praticato per un certo tempo la ricerca della quantità percentuale di emoglobina valendoci dell'emoglobinometro di Gowers modificato dal Sahli. Sospendemmo tali ricerche dopo esserci convinti che la diminuzione dell'emoglobina era perfettamente in rapporto con la diminuzione quantitativa dei globuli rossi.

Per ricercare le variazioni relative delle diverse forme di globuli bianchi, furono allestiti preparati per strisciamento, e sottoposti a varie colorazioni: alcuni, per lo studio dei tripanosomi, sono stati colorati col metodo di Marino; altri, previa fissazione alla temperatura di 110° C. secondo il metodo di Ehrlich, furono colorati colla miscela triacida; altri sono stati trattati con la soluzione colorante di Jenner, ed altri infine, fissati con acetone puro (Jagic), furono colorati con ematossilina ed eosina. Per la

ricerca delle granulazioni basofile fu adoperata la colorazione con la soluzione fenica di tionina secondo Nicolle e col bleu policromo di Unna.

Nella nomenclatura dei globuli bianchi ci siamo attenuti alla classificazione di Ehrlich, come a quella che allo stato presente delle nostre conoscenze risponde alle opinioni più universalmente accettate.

Sulla classificazione dei leucociti granulosi tutti gli autori del resto sono d'accordo. Per i leucociti privi di granulazioni, per quanto la concezione e la conseguente classificazione di Patella siano suggestive, esse mancano ancora di sufficiente conferma e ad ogni modo non sono accolte presentemente dalla maggior parte degli ematologi. Anche recentemente in un complesso lavoro il Ferrata, portando numerose ricerche ed osservazioni personali, confuta le conclusioni del Patella. E' d'altra parte indiscutibile che attenendosi alla classificazione di Ehrlich si incontrano grandi difficoltà nella determinazione dei mononucleati e forme di passaggio. Se il riconoscere nettamente queste cellule dalle forme più grandi di linfociti riesce difficile nel sangue dell'uomo, di gran lunga più arduo è il riconoscerle negli animali da noi studiati. Vi sono molte cellule che hanno da una parte grandissima analogia con forme grandi di linfociti, e dall'altra insensibilmente passano nelle forme di mononucleati grandi. Nè l'affinità basofila del protoplasma, nè il rapporto fra protoplasma e nucleo sono molte volte criterio sufficiente per una esatta diagnosi; d'altra parte non si può più parlare per i linfociti di mancanza di movimento ameboide dopo che è stato dimostrato dai più recenti studi di Jolly, Almkvist, Wolff, Hirschfeld, ecc. che anche queste cellule sono fornite della proprietà di muoversi attivamente; nè si può dire in modo assoluto che i linfociti si distinguano dai grossi mononucleati perchè non sono fagociti; giacchè abbiamo potuto osservare nella piroplasmosi del cane delle cellule sicuramente linfocitarie contenenti nel loro protoplasma corpuscoli rossi più o meno alterati e piroplasmi più o meno profondamente degenerati.

Vogliamo ancora accennare ai globuli rossi policromatici e agli eritrociti contenenti corpuscoli cromofili. Così gli uni come gli altri si riscontrano abbastanza spesso nelle infezioni da tripanosomi e più frequentemente in alcune specie di animali. Alcuni autori seguendo la opinione di Grawitz (1), considerano i corpuscoli rossi policromatici e quelli contenenti granulazioni basofile come cellule colpite da un processo degenerativo. Un'altra serie di autori invece considerano questi eritrociti come indizio di un processo rigenerativo del sangue e per la maggior parte ritengono che la punteggiatura basofila derivi da resti nucleari (Nägeli, Sabrazès, Lutoslawski, Bloch (2), Mayer e Speroni, Vaughan). Altri finalmente ammettono una doppia origine. Le nostre osservazioni ci inducono a ritenere esatto il secondo modo di considerare gli eritrociti policromatofili e quelli con granulazioni basofile disseminate nel protoplasma; avendo avuto occasione di osservare moltissime forme di passaggio tra eritrociti nucleati e contenenti uno o pochi corpi cromofili (del tutto simili a quelli descritti da Nissle e da esso interpretati come residui del nucleo o come centrosomi), e gli eritrociti con granulazioni diffuse e quelli policromatici.

(1) Cit. in NAEGELI. *Ueber die Entstehung*, ecc.
(2) Id.

Osservazioni proprie.

Trypanosoma Brucei.

Cane 11 (1). — Inoculato il 17 gennaio con sangue di cane contenente abbondanti tripanosomi. Al decimo giorno compaiono scarsi tripanosomi nel sangue. Muore in 40ª giornata. Durante la infezione si è avuto opacamento della cornea destra con cecità completa di detto occhio.

All'autopsia: tessuto adiposo sotto-cutaneo ben conservato, gangli linfatici delle stazioni superficiali e profonde tumefatti ed edematosi. Tumore molle di milza con vari infarti anemici, dei quali uno occupa tutto il polo anteriore dell'organo. Infarti polmonari della grandezza da un chicco di miglio sino a quella di un cece. Intorno ai più grandi reazione del tessuto polmonare circostante. Cheratite destra parenchimatosa con essudato fibrinoso-emorragico davanti all'iride, e occlusione completa del foro pupillare.

Le conte dei gobuli rossi e dei leucociti sono state fatte ad intervalli di 5 giorni, raramente più ravvicinate. I globuli rossi diminuiscono da 6,000,000 a 3,800,000: la caduta più rapida si ha tra il 26° e il 30° giorno di malattia in corrispondenza della ricomparsa in circolo dei tripanosomi dopo qualche giorno in cui l'esame del sangue era stato negativo. La curva dei leucociti mostra durante il corso della infezione notevole leucopenia: il numero assoluto dei globuli bianchi si eleva alquanto negli ultimi giorni della malattia, senza raggiungere però la cifra iniziale.

Cane 13. — Inoculazione il 18 febbraio con sangue del cane 11, contenente in discreto numero tripanosomi vivi. Durata dell'incubazione 6 giorni. Cheratite parenchimitasa dell'occhio sinistro in 24ª giornata, dell'occhio destro in 29ª. Muore dopo 33 giorni.

All'autopsia si nota: grasso sottocutaneo e delle cavità abbastanza conservato; lieve tumore delle glandole linfatiche; grosso tumore molle di milza, senza infarti. Non broncopolmonite. Gastrite emorragica non grave. Negli occhi notevole ispessimento delle due cornee che sono del tutto opacate: il foro pupillare è occluso da un coltrone di essudato fibrinoso-emorragico, lassamente aderente all'iride, non alla superficie posteriore della cornea.

In questo cane le conte furono fatte quasi sempre con intervalli di 3 giorni. Il reperto parassitario fu sempre positivo e nulla di notevole presenta la curva dei globuli rossi, nè quella dei leucociti:

---

(1) Riferiamo soltanto degli animali che si sono potuti seguire più completamente durante il corso dell'infezione. Manteniamo il numero col quale gli animali sono contrassegnati nel protocollo di laboratorio.

si noti solo che il numero di questi si è mantenuto costantemente basso. Si noti ancora che a gravi accessi febbrili (come quello presentato nel 21° giorno di malattia) non è conseguito alcun abbassamento del numero dei globuli rossi: non è dunque la febbre che determina quelle rapide diminuzioni numeriche degli eritrociti, quali osserveremo in seguito.

Cane 14 [fig. 1 a sinistra (1)]. — La osservazione di questo animale è stata interrotta dopo pochi giorni, essendo esso fuggito dal laboratorio: ne ri-

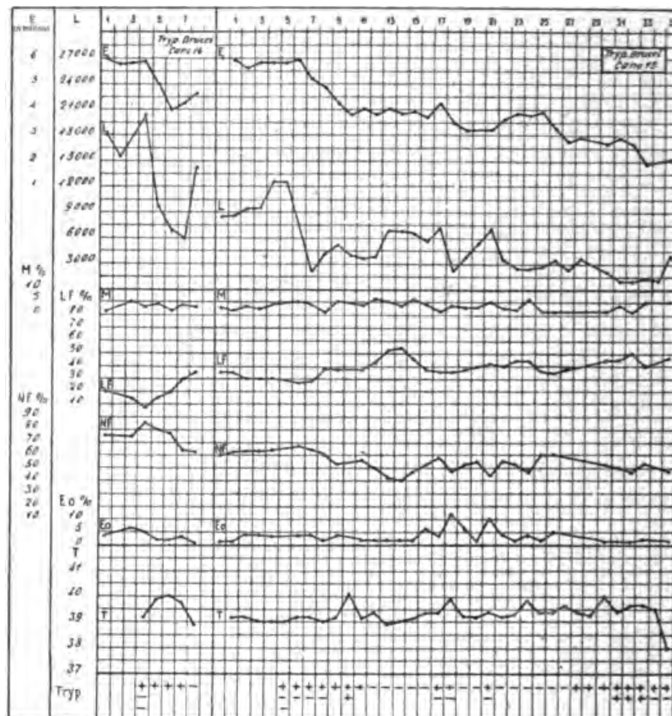


Fig. 1.

portiamo però la storia, perchè molto interessante. Inoculato con sangue di cavia, contenente tripanosomi in discreto numero, ha avuto un breve periodo di incubazione (3 giorni). I tripanosomi si sono osservati in circolo per 4 giorni, quindi sono scomparsi, per ricomparire dopo 2 giorni di assenza.

---

(1) Nella figura è indicato col segno $\overset{+}{=}$ tripanosomi scarsissimi; con $\pm$ tripanosomi scarsi; con + tripanosomi in discreto numero; con $\overset{+}{+}$ tripanosomi abbondanti; con $\overset{+}{\underset{+}{+}}$ tripanosomi molto abbondanti; col segno — reperto parassitario negativo all'esame microscopico.

Il tracciato del numero dei globuli rossi dimostra una brusca caduta in rapporto con la prima comparsa dei tripanosomi: a questa caduta segue un periodo di stato o di lenta rigenerazione. Nel numero assoluto dei leucociti si nota un leggero aumento durante il periodo di incubazione: con la comparsa di tripanosomi si presenta notevolissima leucopenia; quando i tripanosomi scompaiono il numero dei globuli bianchi si innalza di nuovo. Circa la formula leucocitaria si vede come alla leucocitosi corrisponda un aumento dei polinucleati a detrimento dei linfociti: alla leucopenia un notevole aumento relativo di questi con diminuzione corrispondente dei neutrofili. Il numero dei mononucleati si mantiene circa costante: gli eosinofili si presentano più numerosi a 2 riprese, e precisamente nei giorni che hanno preceduto la comparsa in circolo dei tripanosomi.

Cane 15 (fig. 1 a destra). — Inoculato il 13 marzo con sangue di altro cane, contenente tripanosomi vivi. Durata dell'incubazione 4 giorni. Muore al 35° giorno di malattia.

All'autopsia presenta: grasso sottocutaneo ben conservato; lieve tumore ghiandolare; tumore molle di milza; fegato subitterico, reni pallidi, grave bronco-polmonite con noduli grossi, confluenti, specialmente nel lobo medio del polmone destro, che è completamente epatizzato.

Nella curva dei globuli rossi si osserva graduale diminuzione numerica, più rapida in corrispondenza della prima invasione dei tripanosomi. I leucociti aumentano nel periodo di incubazione e l'aumento è dovuto ai polinucleati neutrofili: durante tutto l'ulteriore decorso della malattia si ha leucopenia, e la cifra è più bassa nei periodi in cui sono più abbondanti i tripanosomi: fra i globuli bianchi predominano i linfociti. In un periodo in cui i tripanosomi del sangue periferico erano scarsi, vi sono stati tre innalzamenti nella curva degli eosinofili, che non saprei mettere in rapporto con alcun fatto speciale.

Cane 16 (fig. 2). — Inoculato il 19 aprile con sangue di un coniglio, contenente abbondanti tripanosomi vivi. Durata dell'incubazione 5 giorni. Nell'ultimo periodo di vita cheratite parenchimatosa in ambedue gli occhi. Muore dopo 58 giorni di malattia.

All'autopsia: tumefazione delle ghiandole ascellari, notevole tumore molle di milza. Ittero abbastanza grave. Nefrite parenchimatosa.

Questo cane ha presentato un comportamento degli elementi figurati del sangue molto caratteristico: è opportuno esaminarlo un po' particolarmente.

Il numero assoluto dei globuli rossi, durante la malattia, da circa 6,000,000 è disceso ad 1,300,000. La curva presenta varie brusche diminuzioni: la prima fra il 5° e il 6° giorno di malattia, la seconda fra

il 12° e il 13°, la terza fra il 15° e il 16°, la quarta nel 26° e seguenti, l'ultima fra il 38° e il 42° giorno. Ora a tutte queste discese corrisponde esattamente il presentarsi dei tripanosomi nel sangue circolante, mentre non tutte sono in rapporto con i più forti innalzamenti della temperatura. Già uno di noi (Levi Della Vida) ha dimostrato che non sempre vi è coincidenza fra l'accesso febbrile e la comparsa in circolo dei tripanosomi. I leucociti, dopo un piccolo

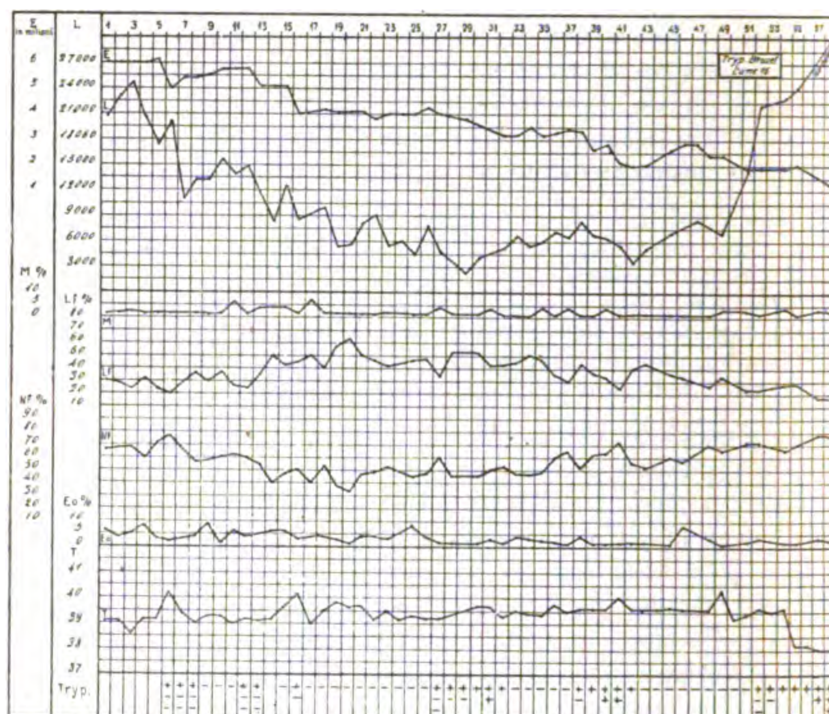


Fig. 2.

aumento nel periodo di incubazione, con la comparsa dei tripanosomi diminuiscono bruscamente e notevolmente, mantenendosi in numero bassissimo per tutta la durata della malattia: nell'ultimissimo periodo soltanto si ha notevole leucocitosi (fino a 40,000 per mmc). La percentuale dei mononucleati grandi non presenta variazioni degne di nota. Fra polinucleati neutrofili e linfociti esiste il solito rapporto già osservato in altri casi: leggero aumento dei polinucleati neutrofili con diminuzione relativa dei linfociti nella leucocitosi del periodo di incubazione e in quella corrispondente agli ultimi giorni della infezione: notevolissimo aumento della percentuale di cellule linfocitarie (fino al 65 %) con diminuzione dei neu-

trofili in tutto il rimanente tempo della malattia. Gli eosinofili aumentano a varie riprese, e almeno per 4 volte l'aumento o precede di 2 o 3 giorni il reperto parassitario positivo, o coincide con esso.

Coniglio 7 (fig. 3). — Inoculazione il 24 maggio con sangue di una cavia, contenente abbondanti tripanasomi vivi. Già nel secondo giorno dopo l'inoculazione si scorge qualche tripanosoma nel sangue periferico. Muore dopo 33 giorni.

All'autopsia non si rileva nessuna alterazione importante.

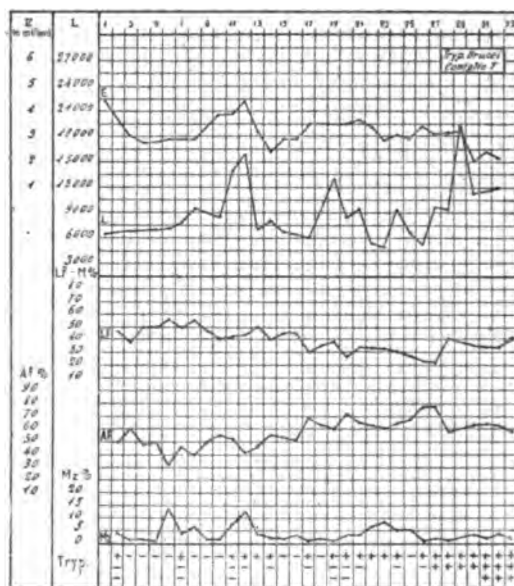


Fig. 3.

Durante la malattia vi è stata diminuzione abbastanza notevole dei globuli rossi (circa della metà): la curva degli eritrociti non presenta alcuna particolarità degna di nota, tranne il fatto che il primo abbassarsi del numero dei globuli rossi coincide col primo apparire dei tripanosomi. È questo il primo animale nel quale non si è avuta leucopenia, chè anzi in alcuni giorni il numero dei leucociti è salito ad una cifra di molto superiore alla normale. Questo aumento è dovuto per quasi tutta la durata della malattia ad un aumento del numero assoluto dei linfociti e mononucleati, e nell'ultimo periodo soltanto ad un aumento della cifra assoluta dei polinucleati anfofili. Un comportamento interessante hanno presentato le *mastzellen*, il cui numero si è notevolmente accresciuto a tre ri-

prese: le prime due volte, la vigilia o il giorno stesso della comparsa (o ricomparsa) dei tripanosomi nel sangue periferico, l'ultima volta quando il reperto parassitario da scarso è divenuto abbastanza abbondante.

Cavia 2. — Inoculazione il 28 gennaio con sangue di un'altra cavia, contenente abbondanti tripanosomi. Durata dell' incubazione 9 giorni. Muore dopo 38 giorni di malattia.
All'autopsia nulla d'importante.

L'esame della formula leucocitaria ci dimostra anche qui un leggiero aumento di polinucleati anfofili nei primi giorni della malattia, e quindi un aumento notevole, progressivo dei linfociti e dei mononucleati.

Cavia 17. — Inoculazione il 16 maggio con sangue di una cavia morta. contenente tripanosomi ancora ben conservati e mobili. Durata del periodo d'incubazione 9 giorni. Muore dopo 25 giorni di malattia.

Il numero dei globuli rossi è notevolmente diminuito, e, fatta eccezione di un ultimo abbassamento premortale, la curva degli eritrociti ha presentato due cadute: la prima in corrispondenza dell'apparire in circolo dei tripanosomi; la seconda quando sono notevolmente aumentati. Non vi è stata mai leucocitosi: il numero totale dei globuli bianchi si è aggirato per lo più intorno alla cifra normale, talvolta si è di molto abbassato.

Trypanosoma equinum.

Riportiamo la storia di due cani nei quali meglio si può studiare la curva emoleucocitaria.

Cane 4 (fig. 4). — Inoculato il 27 febbraio con sangue di un ratto, contenente abbondanti tripanosomi; incubazione brevissima di 3 giorni: durata totale della malattia 33 giorni.
All'autopsia si sono riscontrate le glandole linfatiche notevolmente tumefatte, congeste ed emorragiche; grave tumore, non molle, di milza; fegato e reni itterici. Opacamento completo delle due cornee e presenza di essudato fibrinoso-emorragico sulla faccia anteriore dell'iride.

La curva totale dei globuli rossi è rappresentata da una serie di bruschi abbassamenti, corrispondenti il primo alla comparsa in discreto numero dei tripanosoni in circolo; gli altri (poichè il reperto parassitario si è mantenuto sempre positivo) a quei giorni in cui il numero dei tripanosomi diveniva più alto in confronto ai

giorni precedenti. I leucociti sono sempre stati più scarsi che non

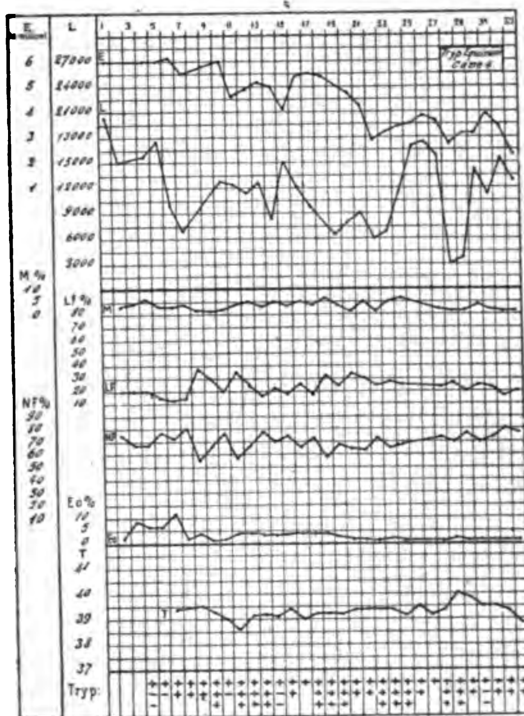


Fig. 4.

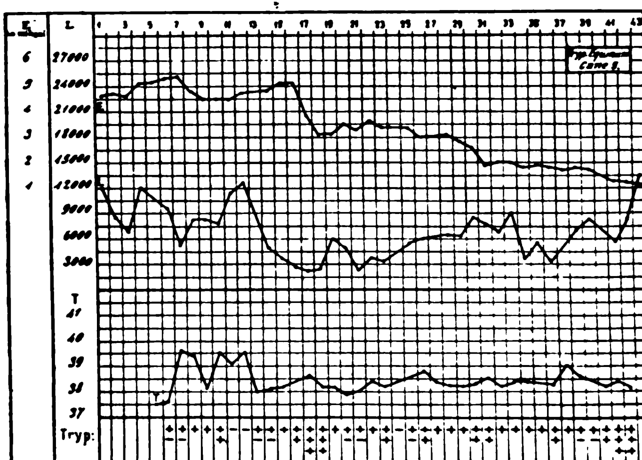


Fig. 5.

lo fossero prima della infezione e alcune volte anzi hanno raggiunto una cifra bassissima. Dopo la leggera polinucleosi dei primi giorni

sono stati abbondanti rispetto ai polinucleati in modo costante, se non molto notevole, i linfociti e mononucleati. Si è osservato inoltre una discreta eosinofilia nei primi giorni in cui si sono presentati i tripanosomi.

CANE 5 (fig. 5). — Inoculato il 23 aprile con sangue di cane, contenente abbondanti tripanosomi. Il periodo di incubazione fu di 5 giorni. La durata della malattia di 43.

All'autopsia si riscontra liquido nelle cavità peritoneale e pleuriche; tumore e congestione di tutte le ghiandole linfatiche, tumore acuto di milza.

Il tracciato degli eritrociti, come nel cane precedente, dimostra un abbassamento in corrispondenza dei primi reperti positivi, e in seguito un'altra forte diminuzione in quei giorni in cui i tripanosomi divengono più abbondanti. La curva dei leucociti, che si mantiene alta durante i primi 12 giorni della malattia, si abbassa poi fino a cifre molto piccole, e risale soltanto negli ultimi giorni di vita, senza però mai sorpassare la cifra iniziale.

TRYPANOSOMA GAMBIENSE.

CANE A. — Inoculato il 10 febbraio con il sangue di una cavia, abbastanza ricco di tripanosomi. Dopo 9 giorni si riscontrano nel sangue alcuni parassiti: e questi si trovano, sempre in scarso numero, a vari intervalli fino al 69° giorno. Da allora l'esame microscopico è riuscito sempre negativo: però il cane era ancora infetto certamente fino al 90° giorno dalla inoculazione, poichè una cavia, inoculata con sangue prelevato in questo giorno, dopo un periodo di incubazione lunghissimo (38 giorni) ha presentato nel sangue forme di tripanosoma (1).

Il numero dei globuli rossi del cane A da 6,500,000 circa per mmc. è caduto, contemporaneamente alla comparsa dei tripanosomi, a 3,600,000 e intorno a questa cifra si è mantenuto finchè si è prolungata la osservazione. I leucociti pure, terminato il periodo di incubazione, si sono abbassati ad una cifra di molto inferiore alla iniziale, e intorno a tale cifra hanno costantemente oscillato.

CANE B (fig. 6). — E' stato inoculato contemporaneamente al cane A il 10 febbraio, con lo stesso materiale infettante. Durata dell'incubazione 13 giorni, morte dopo 70. Durante la malattia ha presentato spesso apatia e sonnolenza.

---

(1) Il cane è morto per malattia intercorrente sei mesi e mezzo dopo la inoculazione. Le osservazioni ematologiche furono sospese dopo circa tre mesi.

Alla sezione si è riscontrato: grasso sotto-cutaneo e delle cavità ben conservato. Tumefazione, edema, congestione delle glandole linfatiche superficiali e delle profonde. Infarti nei due polmoni con noduli di broncopolmonite reattiva. Nella cavità peritoneale liquido citrino limpido in discreta quantità. Perinefrite suppurativa a destra: la cavità ascessuale si estende lungo l'uretere e giunge quasi fino alla vescica. Tumore molle di milza con ascessi metastatici. Fegato congesto. Ispessimento della capsula fibrosa del rene sinistro, con notevole sviluppo vasale ed emorragie sottocapsulari. Infarti, prevalentemente bianchi, nella sostanza corticale dei due reni.



FIG. 6.

L'esame delle curve emoleucocitarie dimostra diminuzione degli eritrociti, ed anche in questo caso le maggiori e brusche diminuzioni si hanno in quei giorni in cui il reperto parassitario diventa positivo (per esempio dal 33° al 35° giorno di malattia; dal 50° al 51°): diminuzione del numero totale dei leucociti, quasi costante per tutta la durata della malattia; leggero aumento della percentuale dei polinucleati neutrofili nel periodo d'incubazione, durevole aumento

dei linfociti e mononucleati fino agli ultimi giorni, in cui aumentano di nuovo i polinucleati neutrofili, forse in rapporto con la suppurazione perirenale.

Cavia 24 (fig. 7). — Inoculazione il 18 aprile con sangue del cane B. Durata del periodo d'incubazione 12 giorni, della malattia 41 giorni.

All'autopsia si è riscontrato: tumefazione delle ghiandole linfatiche superficiali e profonde; tumore di milza, con piccoli infarti di data più o meno recente.

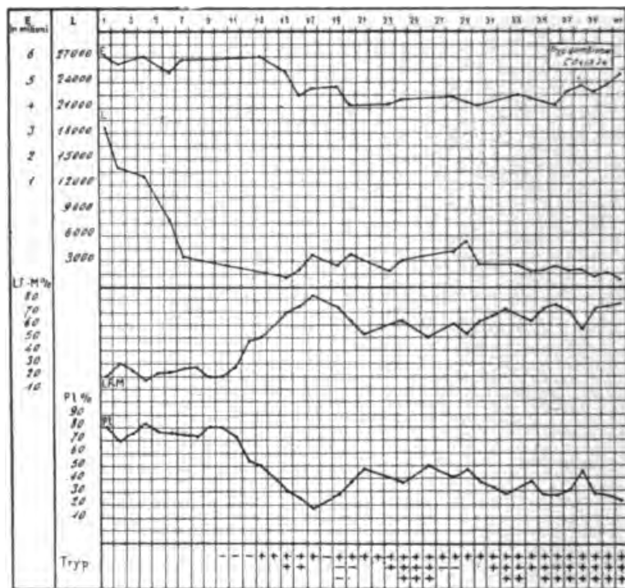


Fig. 7.

In questa cavia non è stata notevole la diminuzione dei globuli rossi: essa però è incominciata contemporaneamente alla comparsa nel sangue dei tripanosomi. Molto dimostrativa è la curva dei leucociti, che indica una intensissima leucopenia, stabilitasi già negli ultimi giorni del periodo d'incubazione. Con la comparsa dei tripanosomi in circolo incomincia l'aumento relativo dei linfociti e mononucleati che va facendosi sempre più manifesto: nell'ultimo giorno di vita i polinucleati sono ridotti al 20 % della cifra totale dei leucociti.

Considerazioni intorno ai risultati complessivi delle ricerche ematologiche.

Dalle osservazioni fin qui riferite risaltano alcuni fatti che si verificano costantemente in tutti gli animali infettati con tripanosomi, e che sono specialmente evidenti nella infezione da *Tripanosoma Brucei*.

I globuli rossi vanno diminuendo per tutta la durata della malattia; in corrispondenza poi del primo apparire dei tripanosomi, e quasi sempre in corrispondenza del successivo riapparire od aumentare di essi dopo periodi di assenza o di reperti scarsi, si ha una diminuzione più rapida del numero totale degli eritrociti. Queste diminuzioni non si possono mettere in rapporto con gli accessi febbrili. Non abbiamo mai constatato la distruzione dei globuli rossi in rapporto con le remissioni del numero dei tripanosomi, come Nissle avrebbe osservato. Dopo una notevole diminuzione degli eritrociti il numero di essi rimane per alcuni giorni stazionario oppure aumenta, ma sempre molto lentamente e in lieve misura. Si ha talora presenza di normoblasti, raramente di megaloblasti e megalociti: non di rado si trovano globuli rossi policromatici, con granulazioni basofile e con corpi cromofili.

Fatta eccezione per il coniglio 7, nelle infezioni da tripanosomi da noi studiate, dopo un leggiero aumento della cifra totale dei leucociti (che crediamo sia da ritenersi conseguente alla inoculazione endoperitoneale) si ha sempre leucopenia, per tutta la durata della malattia, fino agli ultimi giorni prima della morte: in questi il numero dei leucociti può aumentare leggermente e può anche aversi, come nel cane 16, un'intensa leucocitosi. In generale il numero dei leucociti è tanto più basso quanto più numerosi sono i tripanosomi.

Nelle infezioni da tripanosoma, trascorso il primo periodo di incubazione, vi è un notevole aumento nella percentuale dei linfociti: e sono abbondantissime nel sangue quelle forme di linfociti giovani quali si osservano normalmente nei centri germinativi delle ghiandole linfatiche e nel sangue circolante nella leucemia linfatica.

Se non sempre, per lo meno tanto spesso da non potersi pensare ad una semplice coincidenza fortuita, abbiamo osservato nei cani due o tre giorni prima della comparsa dei tripanosomi, e talora contemporaneamente ad essa, un discreto aumento del numero re-

lativo degli eosinofili. Tali eosinofili differiscono per lo più da quelli normali, in quanto che spesso hanno un nucleo unico rotondeggiante o poco lobato, e contengono granulazioni più grosse e irregolari dei comuni leucociti oxifili della stessa specie animale.

Dai dati di fatto su esposti risulta che gli animali infetti con tripanosomi sono colpiti da una anemia che per alcuni caratteri si accosta alle anemie perniciose (presenza di megaloblasti): però da una parte lo scarso numero degli elementi midollari nel sangue periferico, dall'altra lo stato anatomico del midollo osseo che nelle autopsie non fu mai osservato rosso nè color cioccolatta, ma sempre giallastro o appena iperemico, non solo nelle diafisi delle ossa lunghe, ma talora anche nelle epifisi, ci permettono di inferirne che il processo rigenerativo del sangue è sempre molto scarso, forse perchè l'infezione colpisce e altera anche il midollo osseo.

In quanto alla leucopenia la sua origine deve essere ricercata in parecchie cause. Si può forse ammettere che i tripanosomi esercitino un'azione chemiotattica negativa sui leucociti, agiscano cioè in modo analogo ad alcuni batteri (colera dei polli). Vi è però chi nega questa origine chemiotattica negativa alle leucopenie: Werigo afferma che questa è dovuta all'accorrore dei leucociti negli organi interni; e Levaditi, contrariamente alla interpretazione di Battelli e Mioni, ritiene che la leucopenia che si ottiene con iniezioni di sangue eterogeneo sia dovuta al rifugiarsi dei leucociti negli organi interni per esercitarvi un'azione fagocitaria. Nelle infezioni da tripanosomi è stata dimostrata da Rodet e Vallet l'azione tripanolitica della milza e degli organi linfatici: gli autori ammettono che si tratti di una distruzione extra-cellulare: però è certo (e lo si può constatare facilmente nei preparati colorati della polpa splenica e delle ghiandole linfatiche) che quivi si compie un'attivissima fagocitosi dei tripanosomi e delle parti disgregate di essi. In tali condizioni è logico supporre che in questi organi vi sia durante l'infezione un accumulo di leucociti, tale da determinare una diminuzione di essi nel torrente circolatorio. D'altra parte ancora lo scarso potere rigenerativo del midollo osseo deve avere la sua importanza nello spiegare la leucopenia (vedi a questo proposito quanto si osserva nella malaria. — Marchiafava e Bignami, *La infezione malarica*, p. 221).

Nelle tripanosomiasi non solo è abbassato il numero assoluto dei globuli bianchi: ma la presenza dei tripanosomi esercita anche una azione inibitrice sullo stabilirsi di una leucocitosi. Abbiamo potuto convincerci di questo fatto inoculando contemporaneamente a cani normali e a cani infetti da tripanosomi una piccola quantità di olio

essenziale di trementina: così nei primi come nei secondi si determina la formazione di un ascesso, ma in quelli si stabilisce una leucocitosi di gran lunga più intensa che in questi.

L'aumento relativo dei linfociti è agevolmente spiegato dalla iperplasia degli organi e tessuti linfopoietici. In quanto agli aumenti periodici degli eosinofili, osservati nel cane, pur senza entrare a discutere le teorie sulla origine degli eosinofili che anche recentemente hanno fornito oggetto di studi e di polemiche a Weidenreich, Ascoli e Pappenheim, non crediamo che agli eosinofili da noi osservati si debba attribuire un'origine diversa dalla midollare: tanto più che il comportamento descritto per gli eosinofili nel cane, abbiamo osservato nel coniglio 7 per le mastzellen. Il Giani ha potuto constatare nella reazione midollare all'azione di alcuni microrganismi e dei loro prodotti, l'assoluta indipendenza dell'aumento dei neutrofili dall'aumento degli eosinofili. Si tratta probabilmente, anche nel nostro caso, di una reazione midollare limitata alle sole cellule oxifile, le quali vengono nel torrente circolatorio non ancora perfettamente uguali ai polinucleati eosinofili normali.

Se si istituisce un paragone fra il reperto ematologico nelle infezioni da tripanosomi e quanto si osserva nelle piroplasmosi del cane (e che forma oggetto di studio per parte di uno di noi — Levi Della Vida), si può dire che in quest'ultima infezione l'anemia si stabilisce molto più rapidamente e con una progressione costante: però il processo di restaurazione per parte del midollo osseo è di gran lunga più intenso: non vi è leucopenia, anzi per lo più leucocitosi più o meno manifesta, con aumento specialmente dei leucociti privi di granuli. Nelle piroplasmosi spesso si osservano nel sangue circolante fagocitosi di globuli rossi e di parassiti da parte dei mononucleati grandi e dei linfociti: nelle tripanosomiasi non abbiamo mai osservato processi fagocitari nei preparati dal sangue periferico.

Conclusioni.

Riassumendo in brevi conclusioni i fatti più concordi e meglio accertati possiamo fissare questi punti fondamentali:

I. — Il comportamento dei globuli rossi nelle tripanosomiasi sperimentali da noi studiate segue un tracciato che si abbassa, ma non gradualmente, bensì con brusche cadute, alle quali segue un periodo di stato o di lenta rigenerazione: questo tracciato si osserva a preferenza nei cani e più nella infezione da *Tryp. Brucei*. La prima

caduta dei globuli rossi coincide con la comparsa dei tripanosomi in circolo; per lo più le altre cadute corrispondono alla ricomparsa dei tripanosomi nel sangue periferico dopo un periodo di tempo nel quale non si erano più riscontrati.

II. — Nelle tripanosomiasi la curva totale dei leucociti segue regolarmente, ma inversamente, la curva dei tripanosomi: vi è durante l'infezione leucopenia di solito intensa, tranne che nel periodo di incubazione, e, per lo più, nell'ultimo periodo premortale: quanto maggiore è il numero dei tripanosomi tanto minore è quello dei globuli bianchi.

III. — L'esame della formula leucocitaria nelle infezioni da tripanosomi dimostra costantemente:

a) durante il periodo d'incubazione poche variazioni o un piccolo aumento dei polinucleati neutrofili;

b) durante la infezione, fino agli ultimi giorni, accentuato aumento dei linfociti;

c) nell'ultimo periodo, quando vi è leucocitosi, si nota aumento dei polinucleati.

La leucocitosi e polinucleosi terminale però si può mettere in rapporto molte volte con complicazioni della malattia.

Nei cani, in corrispondenza della prima comparsa dei tripanosomi e quasi sempre della loro ricomparsa dopo un periodo di assenza, vi è un aumento delle cellule con granulazioni oxifile: nel coniglio pare che le stesse oscillazioni si verifichino per le mastzellen.

Roma, agosto 1906.

BIBLIOGRAFIA.

ALEZAIS. *Eosinophilie myéloïde dans la lèpre.* La Sem. Méd. 1906, p. 164.

ALLARIA. *Dell'azione delle tossine batteriche nei tumori e nel sangue leucemico.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 33, p. 236.

ALMKWIST. Virch. Arch. Bd. 169.

ANDERSON. *Spotted fever (tick fever) of the Rocky Mountains.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1904, Bd. 35, p. 640.

ANNETT. *First Report of the expedition to Senegambia by Dutton a. Todd.* Liverpool School of tropical Medicine, 1902.

ARNETH. *Die neutrophilen Leukozyten bei acuten Infektionskrankheiten.* Jena, 1904.

ID. *Die cachektischen Leukozytose; das Verhalten der neutrophilen Leukozyten beim Carcinom.* Bull. Inst. Past. 1904, p. 989.

ARNOLD. *Zur Morphologie und Biologie der Mastzellen, Leukozyten und Lymphozyten.* Münch. med. Woch. 1906, p. 585.

ASCOLI. *Ueber die Entstehung der eosinophilen Leukozyten.* Folia Haemat. 1904, p. 683.

AXISA. *Ueber Leukopenie bei Maltafieber.* Folia Haemat. 1905, p. 346.

AZZURRINI e MASSARI. *Azione delle tossine tifiche sulla morfologia del sangue e degli organi ematopoietici.* Lo Sperimentale, 1904.

BASTIANELLI. *I leucociti nell'infezione malarica.* Boll. della R. Acc. medica di Roma, 1892, pag. 487.

BATTELLI e MIONI. *Leucopénie et leucocytose par injection de sang hétérogène chez le chien.* C. R. Soc. Biol. 1904, p. 760.

BÉZANÇON et LABBÉ. *Traité d'hématologie.* Paris, 1904.

BILLET. *De la formule leucocytaire dans le paludisme.* XIII Congrès de Méd. Paris, 1900.

ID. *Eosinophilie dans la dysentérie amibienne.* La Sem. Méd. 1906, p. 261.

BLOCH et AUBERTIN. *Eosinophilies myéloïdes.* La Sem. Méd. 1906, p. 104.

BOSC. *Formule hémoleucocytaire de la syphilis.* C. R. Soc. Biol. 1903, n. 21.

BOYCOTT. *Further observations on the diagnosis of Ankylostoma infection, with special reference to the examination of the blood.* Journ. of Hyg. 1904, T. IV, p. 437.

BRINCKERHOFF a. TYZZER. *On amphophile leucocytogenesis in the rabbit.* Journ. of med. Research, 1902, T. VIII, p. 449.

BRUNS, HAYO, LIEFERMANN u. MÄCKEL. *Die Vermehrung der eosinophilen Leukozyten bei Ankylostomiasis in diagnostisch prophilaktischer Bedeutung.* Münch. med. Woch. 1905, p. 253.

BURNETT. *A study of the blood of normal guinea pigs.* Journ. of med. Research, T. XI, p. 537.

CALVERT. *The blood in filariosis.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 53, p. 414.

CARTON. *Modification du sang pendant l'accouchement et les suites des couches normales et pathologiques.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1904, Bd. 34, p. 465.

CIUFFINI. *La formula ematologica nella malaria.* Riv. crit. di Clinica medica 1906, n. 20, 21. 22, 23.

COLES. *The Blood in cases affected with filariosis and Bilharzia haematobia.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1902, Bd. 31, p. 789.

DELANY. *The diagnostic value of blood counts in malarial and other fever.* Bull. Inst. Past. 1903, p. 297.

DIONISI. *Variazioni numeriche dei globuli rossi e bianchi in rapporto coi parassiti della malaria.* Lo Sperimentale, 1891.

ID. *Sulle variazioni degli elementi figurati del sangue nelle febbri malariche.* Il Policlinico, Sez. medica, 1901.

DOPTER et GOURAND. *Leucocytose dans l'urémie expérimentale.* C. R. Soc. Biol. 1903, p. 38.

DOYON et BILLET. *Modifications du nombre des leucocytes dans le sang atropiné. Rapports avec l'incoagulabilité.* C. R. Soc. Biol. 1905, p. 443.

DUTTON, TODD a. CHRISTY. *Reports of the Trypanosomiasis expedition of the Liverpool School of tropical Medicine to the Congo 1903-1904.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1904, Bd. 35, p. 710.

DUTZMANN. *Das Verhalten der weissen Blutkörperchen bei eitrigen Prozessen im genital Apparate der Frau, etc.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 32, p. 393.

FERGUSON. *The leucocytosis of variola.* Bull. Inst. Past. 1903, p. 154.
FERRATA. *I globuli bianchi mononucleati.* Arch. per le Scienze Mediche, 1906, p. 217.
FIGENSCHAU. *Leukozytose bei der crupösen Pneumonie.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 32, p. 341.
GIANI. *Dell'azione locale di alcuni microrganismi e dei loro prodotti solubili sul midollo delle ossa.* Giorn. della R. Acc. di Medicina di Torino, 1904, p. 33.
GIUDICEANDREA. *L'ematologia nella febbre tifoide.* Roma, 1903.
GREIG a. GRAY. *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, 1905, n. 6, p. 3.
HAMBURGER u. REUSS. *Ueber die Wirkung artfredmen gewissen Eiweisses auf die Leukozyten.* Bull. Inst. Past. 1905, p. 988.
HEIMANN. *Numération des leucocytes dans 50 cas de broncopneumonie lobaire ou d'empième chez des enfants.* La Sem. Méd. 1906, p. 30.
HIGLEY. *Differential Leucocytes count in the early days of typhoid fever.* Bull. Inst. Past. 1903, p. 585.
HILLER. *Beiträge zur Morphologie der neutrophilen Leukozyten in ihrer klinische Bedeutung.* Folia Haemat. 1905, p. 85.
HIRSCHFELD. *Beiträge zur vergleichende Morphologie der Leukozyten.* Virch. Arch. 1897, Bd. 149, p. 22.
ID. *Sind die Lymphozyten amöboiden Bewegung fähig?* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1902, Bd. 31, p. 477.
HOFFMANN. *Ueber Quecksilber Dermatitis und die ihr zu Grunde liegenden histologischen Veränderungen nebst Bemerkungen über die dabei beobachtete locale und Bluteosinophilie.* Berl. klin. Woch. 1902, n. 19.
JAGIC. *Ueber Acetonfixierung von Blutpreparäten.* Wien. klin. Woch. 1906, n. 20.
JAKIMOFF. *Modification du nombre des globules rouges dans le Nagana expérimental.* Bull. Inst. Past. 1905, p. 75.
ID. *Zur Frage von den Veränderungen in der Blutzusammensetzung bei experimentellen Trypanosomosen.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1906, Bd. 38, p. 13.
JOLLY. *Sur le mouvement des lymphocytes.* C. R. Soc. Biol. 1902, p. 661.
KELSCH. *Contribution à l'anatomie pathologique des maladies palustres endémiques.* Arch. de physiol. norm. et pathol. 1875-76.
KRESTNIKOFF. *Zur Morphologie des Blutes bei Mumps.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 33, p. 481.
LAVERAN et MESNIL. *Trypanosomes et trypanosomiases.* Paris, 1904.
LEVADITI. *Contribution à l'étude des Mastzellen et de la Mastzellen-leucocytose.* Paris, 1902.
ID. *Les nouvelles recherches hématologiques sur le globule blanc.* Bull. Inst. Past. 1905, n. 19, 20, 21, 22.
LEVI DELLA VIDA. *Alcune osservazioni sulla tripanosomiasi sperimentale.* Boll. della R. Acc. medica di Roma, 1906, p. 287.
LIERMBERGER. *Beitrag zur Behandlung der Anchylostomiasis, etc.* Berl. klin. Woch. 1905, p. 387.
LORTAT-JAKOB. *Recherches sur la leucocytose qualitative dans les angines non dyphtériques.* C. R. Soc. Biol. 1902, p. 706.
LOVE. *An investigation into the leucocytosis of typhus fever.* Bull. Inst. Past. 1905, p. 466.

MAGRATH, BRINCKERHOFF a. BANCROFT. *The leucocyte reaction in variola.* Journ. of med. Research, 1904, T. XI, p. 247.

MARCHIAFAVA e BIGNAMI. *La infezione malarica.* Vallardi, Milano.

MELLAND. *The leucocytes in malaria.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1905, Bd. 32, p. 472.

MEYER u. SPERONI. *Ueber punktierte Erytrocyten.* Münch. med. Woch. 1906, p. 796.

MICHELI. *I leucociti del sangue umano in condizioni normali e patologiche.* Riv. crit. dl Clinica medica, 1905, n. 49. 50; 1906, n. 2, 3, 4.

NAEGELI. *Ueber die Entstehung der basophilgekörnten roten Blutkörperchen.* Münch. med. Woch. 1904, p. 195.

NEUMANN. *Zur Frage der Verwertung der Blutkörperchenzählung für Diagnostik und Indikationsstellung bei gynäkologische Erkrankungen.* Bull. Inst. Past. 1904, p. 988.

NICOLAS, FROMENT et DUMOULIN. *Splénectomie et polinucléose rabique.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1905, Bd. 36, p. 75.

ID. *Splénectomie et leucocytose dans l'intoxication dyphtérique expérimentale.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1905, Bd. 35, p. 394.

ID. *Vaccine et leucocytose chez le lopin normal et splénectomisé.* Bull. Inst. Past. 1905, p. 377.

NISSLE. *Beobachtungen am Blut mit Trypanosomen geimpfter Tiere.* Arch. f. Hyg. Bd. 53, p. 181.

ID. *Blutparasiten und Erytrocytolyse.* Arch. f. Hyg. Bd. 54, p. 343.

NUTTAL. *Canine piroplasmosis,* I. Journ. of Hyg. 1904, T. IV, n. 2.

PANKOFF. *Ueber das Verhalten der Leukozyten bei gynäkologischen Erkrankungen und während der Geburt.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1905, Bd. 36, p. 276.

PAPPENHEIM. Folia Haemat. 1905, p. 92.

ID. Folia Haemat. 1905, p. 254.

PARIS. *Contribution à l'étude des modifications sanguines chez l'enfant dyphtérique traité par le sérum antidyphtérique (Résistance globulaire).* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1905, Bd. 36, p. 362.

PATELLA. *I leucociti non granulosi del sangue, loro genesi e significato.* Siena, 1905.

POECH. *Ueber das Verhalten der weissen Blutkörperchen bei Malaria.* Zeitschr. f. Hyg. 1903, Bd. 52, p. 663.

POLLITZER. *Die Arnethsche Veränderung des neutrophilen Blutbildes.* Deutsche med. Woch. 1906, p. 488.

PRÖSCHER. *Ueber experimentelle Leukozytose.* Folia Haemat. 1904, p. 638.

RODET et VALLÉ. *Distruction des trypanosomes dans la rate.* La Sem. Méd. 1906, p. 283.

ROGERS. *The Diagnostic value of the variations in the leucocites and other blood changes in typhoid and malarial remittent fevers respectively.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1902, Bd. 31, p. 721.

ID. *Note on the diagnostic and prognostic value of the leucocyte variations in asiatic cholera.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 32, p. 370.

ROSS. *Tick fever.* Journ. of tropical Medicine, 1906, p. 65.

SIMON. *Des variations leucocytaires chez les malades atteints de dyphtérie et traités par le sérum antidyphtérique.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1904, Bd. 35, p. 480.

SMITH a. KILBORNE. *Investigations into the nature, causation and prevention*

of Texas or Southern cottle fever. U. S. Departement of Agriculture. Bureau of animal industry. Bull. n. 1, 1903.

STÄUBLI. *Klinische und experimentelle Untersuchungen über Trichinosis und über die Eosinophilie im allgemeinen.* Münch. med. Woch. 1906, p. 84.

THOMAS et BREUIL. *Trypanosomes, Trypanosomiasis and Sleeping Sickness.* Liverpool School of trop. Medicine. Mem. XVI, ref. in Bull. Inst. Past. 1906, p. 122.

VAUGHAN. *On the appearence and significance of certain granules in the eritrocytes of man.* Journ. of med. Research, T. X, p. 342.

WERIGO. *La chimiotaxie négative des leucocytes et des phagocytes en général.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1902, Bd. 31, p. 95.

WERNER u. LICHTENBERG. *Ueber die Wirkung von Cholininjektionen auf die Leukozytenzahl des Kaninchenblutes.* Deutsche med. Woch. 1905, p. 22.

WILLIAMSON. *Ueber das Verhalten der Leucozytose bei der Pneumokokkenerkrankung der Kaninchen und Menschen.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1902, Bd. 31, p. 367.

WEIDENREICH. *Zur Frage nach der Entstehung der eosinophilen Leukozyten.* Folia Haemat, 1905, p. 163.

VINCENT. *Contribution à l'étude du processus leucocytaire dans la malaria.* Ann. Inst. Past. 1897, p. 891.

WOLFF. *Ueber die aktive Beweglichkeit der Lymphozyten.* Berl. klin. Woch. 1902, n. 52.

WURZ et CLERC. *Eosinophilie intense provoquée par la Filaria loa.* C. R. Soc. Biol. 1903, p. 1704.

ZILBERGER et ZELIONY. *De la chimiotaxie négative des leucocytes des lapins infectés par la culture pure de bacilles du choléra des poules.* Ann. Inst. Past. 1901, p. 615.

ZINNO. *Ein seltener Blutbefund (Myelòcytämie) in 2 Fällen von Pest.* Ctbl. f. Bakt. Ref. 1903, Bd. 30, p. 359.

Istituto d'Igiene della R. Università di Messina

Sul passaggio dei germi a traverso le larve di alcuni insetti

del dott. **GIUSEPPE CAO**, assistente e libero docente.

I. — Larve di coleotteri.

Dopo le osservazioni fatte nei lavori precedenti, sul passaggio dei germi a traverso l'intestino di alcuni insetti, volli prendere in esame anche le larve di alcune specie che hanno una importanza speciale nei riguardi dell'igiene.

Fra i coleotteri scelsi le larve di maggiolino, *Melolonta vulgaris*, che appartiene al gruppo dei lamellicorni scavatori.

I lamellicorni scavatori, sieno essi fitofagi o coprofagi, hanno una parte molto notevole nella concimazione dei terreni vegetali. Le loro larve, migrando di continuo, fanno passare a traverso il loro corpo una grande quantità di terreno, con un lavoro assiduo e diuturno, che pare insignificante, se si considera l'opera di un solo individuo, ma che acquista un'importanza considerevole, se si pensa alla enorme quantità di larve che pullulano nei terreni umiferi.

Per il continuo scavare, molta terra che si trovava a una certa profondità è trasportata negli strati superficiali del suolo, a contatto dell'aria atmosferica e dell'acido carbonico disciolto nell'acqua piovana, che procede alla sua disintegrazione, e così avviene pure uno scambio di germi tra i vari strati del suolo.

Erasmo Darwin, al quale non sfuggì l'importanza di questi piccoli agenti nei fenomeni chimici e biologici del suolo, cercò persino, in un'opera memorabile (1), di misurare il colossale lavoro com-

(1) *Earth Worms and vegetable mould.*

piuto, per esempio, dai lombrici, sia calcolando il tempo necessario perchè gli oggetti esposti alla superficie di un campo fossero seppelliti, sia pesando tutti i rigetti emessi durante un anno, su una data superficie di terreno.

Secondo Mingazzini (1), che si occupò, in una serie di ricerche, dell'opera dei lamellicorni scavatori, il lavoro compiuto da questi insetti ha un'importanza molto maggiore di quella compiuta dai lombrici, perchè questi emettono un terreno finamente triturato, in uno stato di fitta agglomerazione e impoverito dei principii organici che essi assimilano, mentre i lamellicorni abbandonano il terreno in uno stato di maggior disgregazione, e meno impoverito di sostanze organiche.

Se questo oscuro ed enorme lavorìo dei numerosi abitatori del suolo ha una grande importanza per l'agricoltura, non è chi non veda quanto esso debba interessare l'igienista. Tutti i germi patogeni che vanno a finire nel suolo, con una grande quantità di prodotti di rifiuto, debbono indubbiamente sottostare alla influenza di questi continui sconvolgimenti dei vari strati di terreno e possono essere modificati nella loro vitalità e nella loro virulenza dagli organismi che essi sono costretti ad attraversare.

Raccolsi il materiale di studio facendo prelevare una grande quantità di queste larve da località diverse, per studiare anzitutto il contenuto di germi del loro canale alimentare, in confronto a quello del terreno nel quale esse vivevano. Le larve erano portate all'istituto insieme con una sufficiente quantità del terreno nel quale esse erano state catturate, ed erano tenute in serbo nello stesso terreno, per utilizzarle man mano che se ne aveva bisogno.

Per prelevare il contenuto intestinale fissavo la larva sul dorso, con l'aiuto di aghi robusti, incidevo longitudinalmente tutta la parete ventrale su la linea mediana, allontanavo ai lati l'abbondante viluppo di vasi chiliferi, e mettevo così alla scoperto il canale alimentare.

Il tubo digerente del maggiolino, studiato e descritto dal Ramdohr e dal Deserres (2), consta di una prima porzione sottile e breve, l'*esofago*, che fa capo a una dilatazione, lo stomaco o *mesenteron*, divisa in tre porzioni, in cui sboccano numerosi *tubi* o *cechi ghiandolari;* ad essa segue il *tenue*, che si assottiglia di nuovo, e successivamente una porzione enormemente dilatata, *crasso* o *sacco*, che nelle più grosse larve può raggiungere il diametro di ½ cm. Nello stomaco si aprono due sistemi ghiandolari, che secernono, uno il succo gastrico, l'altro una grande quantità di

(1) *La concimazione del terreno vegetale per opera di alcuni lamellicorni.* Roma, 1887.

(2) Cfr. MINGAZZINI. *Ricerche sul canale digerente delle larve dei lamellicorni.* Comun. della Staz. Zoologica di Napoli. Vol. IX.

muco, che avvolge tutto il contenuto stomacale, agglutinandolo in certo modo e mantenendolo per un po' resistente all'azione dissolvente dell'acqua.

La reazione del succo gastrico è alcalina. Mentre il ventricolo ha una funzione digestiva, il sacco, come mostra anche la sua costituzione anatomica, ha invece una funzione di assorbimento; in esso le sostanze che hanno già subìta l'azione del succo gastrico, soggiornano a lungo, e delle produzioni chitinose arboriformi, che sporgono nell'interno dell'organo, sono destinate a trattenere le sostanze nutritive, là ove esse debbono essere assorbite. Numerosi poricanali, che perforano la chitina, mostrano la via per la quale avviene l'assorbimento.

Sezionando con forbici sterili le pareti del tubo digerente, prelevavo con l'ansa di platino una porzione del contenuto intestinale, la stemperavo in acqua sterile, che utilizzavo per fare le culture piatte, per l'identificazione delle varie specie microbiche e per le inoculazioni negli animali di esperimento, allo scopo di isolare le specie patogene. Una porzione dell'emulsione, riscaldata per ½ ora a 65°, era utilizzata per la ricerca degli anaerobi patogeni, sia con le culture in tubo ad alto strato di agar, sia per le inoculazioni. Altre culture in terreni glucosati diedero maggior agio a porre in evidenza alcune forme di oidi e di saccaromiceti.

Tutti gli animali inoculati col contenuto intestinale delle larve, morivano, in un periodo di tempo variabile fra uno e quattro giorni, d'infezioni miste. Per lo più si riscontravano all'autopsia infiltrazione edematosa più o meno estesa e più o meno succulenta, talora gelatinosa, talora emorragica, talora anche commista a un lieve grado di enfisema sottocutaneo, talora con ampie sacche a pareti necrotiche, ripiene di un liquido sieropurulento. La milza di solito appariva lievemente ingrandita, qualche volta ingrandita notevolmente, a margini arrotondati. In qualche caso si notò essudazione fibrinosa del pericardio.

L'esame microscopico rilevava quasi sempre la presenza nel sangue di qualche forma batterica. Più forme batteriche apparivano invece sempre all'esame dei preparati per strisciamento della milza, e ancor più spesso nei preparati dall'edema o dal pus del sito d'innesto. Dal sangue e dalla polpa splenica degli animali sezionati si facevano sistematicamente le culture, per l'isolamento dei germi patogeni.

Esaminai così il contenuto intestinale di un gran numero di larve, prelevate da tre località distinte (l'Orto botanico, la villetta Mazzini, una villa privata in Ganzirri) e da diversi punti di essa, bastando talora scavare il terreno in un'area di poco più di un metro quadrato, per catturare centinaia di larve.

Parallelamente a queste ricerche, con colture piatte e con inoculazioni negli animali, esaminavo anche il contenuto microbico del terreno in cui le larve vivevano. Le ricerche furono condotte su due serie di larve della villa di Ganzirri, su tre della villetta Mazzini e su tre dell'Orto botanico.

Qualche tentativo di confronto fra il numero delle colonie sviluppate dal terreno e quelle di un egual volume o di un egual peso di contenuto intestinale, non condussero a risultati concludenti, per la diversa percentuale d'acqua del contenuto gastrico o intestinale e del terreno ambiente delle larve; d'altra parte l'eliminazione dell'acqua avrebbe portato a grandi cause d'errore.

Per fare l'isolamento delle specie patogene del terreno, si stemperavano delle piccole quantità, prelevate da più punti, da una conca di terriccio, accuratamente sciolta e rimescolata, in un grosso tubo di acqua sterile, e s'inoculava l'acqua di lavaggio così ottenuta, prima di lasciarla sedimentare completamente.

Anche all'esame delle piastre rilevai un certo numero di specie di germi patogeni, i quali non si potevano isolare per mezzo dell'inoculazione degli animali, perchè le specie molto virulente uccidevano gli animali di esperimento prima che quelle, dotate di minore virulenza, avessero potuto esplicare la loro azione.

***

Alcune ricerche comparative furono dirette ad esaminare se, corrispondentemente alla diversa funzione e alla diversa reazione, alcalina nello stomaco, neutra nel sacco, fosse dimostrabile nelle due porzioni del canale digerente una notevole differenza tra il numero dei germi patogeni e la loro virulenza.

Le ricerche riguardanti il numero dei germi contenuti nelle due cavità, non dettero risultati molto attendibili, per la differenza di consistenza del contenuto del *mesenteron* e di quello del sacco, e per la maggior quantità di particelle dure che, penetrate in vari pasti successivi, soggiornavano a lungo nel sacco, sia per la funzione di questo, sia perchè la larva non riusciva a liberarsene agevolmente.

Per quanto riguarda la varietà e il numero delle specie, feci delle piastre comparative del contenuto delle due porzioni dell'intestino, ma non trovai differenze degne di nota. Nè le inoculazioni negli animali, eseguite col contenuto dei due segmenti del canale intestinale, permisero di rilevare alcuna differenza, in rapporto alla virulenza dei germi patogeni.

Si isolarono così, per mezzo delle inoculazioni del contenuto intestinale delle larve. i seguenti germi patogeni:

B. coli (il 60 % delle volte);
Bacilli tifosimili (53 %);
Bacilli similcarbonchio (32 %);
Streptococchi (30 %);
B. fluorescens liquefaciens (17 %);
Stafilococco piogene aureo (25 %), citreo (17 %), albo (15 %), tenue (2 %);
Bacilli del tetano, dell'edema maligno, del gruppo delle setticemie emorragiche, vibrioni, bacilli simiItubercolari (5 %).

Dalle osservazioni su accennate ha potuto dedurre:

a) un rapporto costante fra le varie specie di microrganismi esistenti nel terreno e quelli del contenuto intestinale delle larve:

b) una minore varietà di specie nel contenuto intestinale delle larve, in confronto a quella del terreno;

c) una maggior ricchezza di germi patogeni nel contenuto intestinale che non nel terreno;

d) una selezione particolare, per parte delle larve, di alcuni gruppi di germi patogeni, quali il *B. coli* e forme affini, i bacilli tifosimili.

***

È inutile descrivere qui i vari stipiti di *B. coli* o di tifosimili isolati e il loro comportarsi. Voglio solo rilevare il fatto della frequenza di bacilli similcarbonchio e di *B. fluorescens liquefaciens* patogeni. Quest'ultimo bacillo apparve sempre coi caratteri che gli sono noti, a parte il potere patogeno, mentre di bacilli similcarbonchio, oltre a due stipiti non patogeni, ebbi ad osservarne ben 4 varietà patogene, di cui mi piace riassumere i caratteri nell'unito specchietto.

Caratteri dei quattro tipi di similcarbonchio patogeni.

	Aspetto delle colonie	Sviluppo in gelatina	Mobilità	Aspetto morfologico	Aspetto delle patine	Invecchiamento delle culture	Potere patogeno
A	Colonie simili a quelle del carbonchio	Gelatina fusa lentamente	Mobile	Estremità tagliate a picco	Patina scura	Molte forme involutive precoci	Intensissimo
B	Colonie granulose rotonde	Gelatina fusa lentamente	Mobilità scarsa	Estremità arrotondate	Patina giallastra	Senza forme involutive	Discreto
C	Colonie rotonde opache	Gelatina fusa lentamente	Immobile	Estremità tagliate a picco	Patina giallastra	Senza forme involutive	Intenso
D	Colonie identiche a quelle del carbonchio	Gelatina fusa rapidamente	Mobilissimo	Identici ai bacilli del carbonchio	Patina bruniccia	Molte forme involutive	Scarso

Io stesso ebbi a descrivere già altre forme di bacilli similcarbonchio, patogeni per gli animali di esperimento, in altri lavori, ove si troverà la bibliografia completa su l'argomento (1).

Fra i germi patogeni che non si isolarono con le inoculazioni negli animali, ma che apparvero nelle piastre di controllo del contenuto intestinale delle larve, hanno un interesse speciale due bacilli resistenti agli acidi, uno a pigmento roseo, l'altro a patina tendente all'aranciato, dotato di scarso potere patogeno, per la descrizione dei quali rimando il lettore a una recente pubblicazione del dott. Lombardi (2), che si occupava allora dei bacilli similtubercolosi ed al quale li cedetti per lo studio.

Fra i bacilli non patogeni presentavano uno speciale interesse due cromogeni, uno a patina giallo-bruna, che colorava l'agar di una tinta arancione vivacissima (bacillo, corto, vacuolato, lentamente fondente la gelatina, che coagula il latte), mentre su patate dava sviluppo a una patina arancione; l'altro a patina bianchiccia, tendente al verde-pistacchio, che dopo 5-6 giorni conferiva ai terreni di nutrizione solidi, agar, gelatina, patata, una colorazione violetta intensa, che invecchiando imbruniva passando a un tono verde-oliva. La produzione del pigmento non era però costante, e di molti tubi dello stesso substrato di nutrizione, innestati contemporaneamente e tenuti nelle stesse condizioni d'ambiente, solo in alcuni appariva la colorazione caratteristica. Si trattava di un bacillo piccolo, corto, immobile, asporigeno, non resistente al Gram, che coagulava il latte e fondeva la gelatina.

***

Per vedere come si comportassero i germi a traverso il tubo digerente delle larve di maggiolino, oltre a giovarmi delle numerose osservazioni comparative fatte sul contenuto di germi di un dato terreno e quelle delle feci di larve, che avevano vissuto in esso per qualche tempo, seguii anche altre vie.

Arricchivo perciò il terreno di certe specie di germi, di cui le colonie facilmente si potessero rilevar nelle piastre (B. cromogeni, oidi, streptotricee, ecc.), e immettevo poi le larve in quel terreno, osservando poi le loro feci dopo qualche tempo; scarso assegnamento potevo fare su le ino-

(1) *Sul passaggio dei germi attraverso l'intestino di alcuni insetti.* Napoli, L'Ufficiale sanitario, 1898. — *Nuove osservazioni*, ecc. Questi Annali, 1906, fascicolo III.
(2) *Sui bacilli acidoresistenti.* Questi Annali, 1906, fascicolo II.

culazioni delle feci agli animali, per lo studio del passaggio dei germi patogeni, per la costante presenza di germi dotati di notevole virulenza nell'intestino delle larve.

Altra via era quella di sterilizzare il terreno e di inquinarlo poi artificialmente, immettendovi in seguito le larve; ma prescindendo dalle difficoltà di sterilizzare il terreno, la sterilizzazione stessa induceva in esso delle modificazioni tali, che i risultati ottenuti non potevano essere ragionevolmente ragguagliati a quelli ottenuti col terreno naturale. La sterilizzazione con la bollitura o quella a vapore provocavano l'eliminazione dei gas contenuti nel terreno, il quale poi, evaporando l'acqua, diveniva compatto e cementante e immobilizzava le larve che vi erano state immesse quando esso era ancora umido, uccidendole per manzanza di ossigeno, o quanto meno impedendo lo svolgersi naturale dei fenomeni di assunzione del cibo e di migrazione nel suolo. Oltre a ciò si potevano scomporre delle sostanze organiche necessarie alla vita delle larve, e si poteva modificare anche la reazione del terreno.

Nè si poteva pensare a una sterilizzazione a secco, che avrebbe indotto nel terreno modificazioni ancora più notevoli, le quali avrebbero allontanato sempre più le esperienze dalle condizioni naturali.

Una terza via era quella di alimentare le larve con pappa di pane sterile imbevuta di una sospensione di microrganismi. Ma anche così ci si allontanava troppo dalle condizioni naturali, obbligando le larve, adattate a trarre il nutrimento da una grande quantità di sostanza inorganica, a trovarlo riunito in piccolo volume di sostanza organica; d'altra parte si toglieva alla loro dieta la maggior parte dei materiali inorganici, di cui certamente esse pure hanno bisogno.

La via più rigorosa, che si avvicinava meglio alle condiziorni normali di vita della larva, era certamente quella di immettere direttamente nell'esofago delle larve i germi dei quali si voleva studiare il passaggio; ma questa via non permetteva di eliminare l'azione degli altri germi assunti col terreno.

Ma se alcuna via di per sè non permetteva di trarre delle conclusioni decisive, si poteva tuttavia ripromettersi di trarre, da molteplici esperienze condotte nei vari modi, dei risultati relativamente attendibili.

Alcune larve furono perciò poste in scatole di vetro con una certa quantità di terreno, su cui era stata spruzzata una sospensione di germi che davano colonie facilmente riconoscibili nelle piastre. Naturalmente delle culture piatte preliminari, allestite col terreno e con il contenuto intestinale delle larve, assicuravano che il germe in esperimento non si trovasse già per avventura nel suolo o nelle feci.

È inutile che qui mi dilunghi in particolari di esperienze condotte analogamente a quelle anteriori su l'intestino delle blatte, tanto più che anche i risultati ottenuti hanno molta analogia con quelli dei lavori precedenti; mi limiterò quindi a riferire come, dall'esame dei fatti risulti:

a) che tutti i germi presi in esame passano a traverso l'intestino delle larve;

b) che alcuni di essi vi soggiornano a lungo, moltiplicandovisi (furono seguiti per 30-35 giorni) e sono il bacillo del carbonchio, il *B. coli*, i bacilli tifosimili, il b. piocianeo, il b. prodigioso;

c) che altri, come le streptotricee, i bacilli simiItubercolari, gli stafilococchi, non vi si moltiplicano e sono eliminati più o meno rapidamente (8-12 giorni);

d) che il bacillo del carbonchio sporifica lentamente nell'intestino delle larve;

e) che i batteri patogeni attenuati non riesaltano la loro virulenza nel passaggio a traverso l'intestino delle larve, nè tampoco vi acquistano potere patogeno i batteri saprofiti comuni.

***

Si studiò pure il comportarsi dei germi nel loro passaggio a traverso le larve di maggiolino, dopo avere modificato artificialmente l'ambiente intestinale di queste. Si seguirono perciò gli stessi metodi seguiti nelle esperienze precedenti su le blatte, adoperando specialmente quei mezzi che, in quegli insetti (di cui sempre l'ambiente intestinale apparve più propizio allo sviluppo dei germi patogeni e alla elevazione della loro virulenza), avevano dato risultati più spiccati, quindi l'alternata alimentazione alcalina e acida e la somministrazione coi cibi di infusi putridi. La tecnica seguita non differì da quella adoperata nelle analoghe esperienze su le blatte.

Le esperienze non si poterono estendere come in quegli insetti, perchè non si riuscì mai, neanche con un lungo digiuno, a svuotare completamente l'intestino delle larve o ad ottenere una attenuazione dei germi esistenti nel loro canale alimentare, sufficiente a poter saggiare, con l'inoculazione diretta negli animali del contenuto intestinale, la virulenza dei germi somministrati, ma si dovettero adoperare i germi isolati dalle piastre.

Da queste esperienze pertanto risultò che modificando artificialmente l'ambiente intestinale delle larve, si possono indurre nei germi ingeriti da esse delle notevoli modificazioni di virulenza, ma non tali da poter attribuire una grande importanza al passaggio dei germi a traverso l'intestino delle larve, come fattore di esaltamento di virulenza dei germi patogeni.

Da questa prima serie di esperienze posso quindi concludere:

a) *che esiste un rapporto costante fra la flora microbica intestinale delle larve di maggiolino e quella del terreno, ma nell'intestino delle larve si selezionano a preferenza certi germi patogeni* (B. coli, *bacilli tifosimili*);

b) *che mentre tutti i germi presi in esame passano a traverso l'intestino delle larve, alcuni vi soggiornano molto più a lungo e vi si moltiplicano, mentre altri ne sono eliminati in breve;*

c) *che modificando artificialmente l'ambiente intestinale delle larve, alcuni germi saprofiti vi possono acquistare un certo grado di potere patogeno.*

II. — Larve di ditteri.

Mentre un gran numero di osservatori hanno preso in esame la questione della importanza delle mosche nella trasmissione delle malattie infettive, sia per quanto riguarda i germi assunti col cibo e poi emessi con le feci, sia per quanto si riferisce a quelli trasportati meccanicamente con le zampe, nessuno, ch'io mi sappia, ha studiato ancora il destino dei germi che penetrano col cibo nel canale intestinale delle voracissime larve di questi ditteri così diffusi.

Le specie più comuni e più importanti, per lo studio di cui mi sono occupato, sono, oltre la mosca comune, *Musca domestica*, che depone le sue uova nelle immondezze, nei canali di spurgo, su i letamai, ecc., la mosca azzurra o *moscone*, *Calliphora vomitoria*, assai più grossa di quella, dall'addome azzurro cupo, a strie trasversali nere, a riflessi metallici, munita di abbondante pelurie; la mosca grigia, *Sarcophaga carnaria*, ancora più grossa della precedente, col corsaletto a strie longitudinali, meno diffusa, e infine la mosca verde, *Lucilia caesar*, grande quanto una mosca comune, ma più tozza, d'un bel verde dorato, come la pellicola che ricopre la superficie delle soluzioni concentrate dei colori di anilina.

Mentre la mosca domestica depone le sue uova su qualunque materiale, le altre tre specie cercano a preferenza le carogne e depongono le uova anche agli orifizi nasali, boccali e anali degli uomini addormentati (miiasi), e sono attratte in gran numero dall'odore della carne in putrefazione.

La più comune e la più vorace è la *C. vomitoria*, la mosca azzurra, che emette una grande quantità di uova (di cui ha gremito l'addome), le quali, dopo poche ore, si schiudono in larve vivacissime e dotate di una prodigiosa voracità.

Se si espone all'aperto, su una terrazza, il corpo di un coniglio sezionato, dopo poche ore, specie se la temperatura è elevata e la putrefazione si inizia rapidamente, all'interno della bocca e delle narici, sotto le palpebre, in prossimità dell'orifizio anale e dei genitali esterni, fra i peli delle parti meglio protette, a seconda della

posizione della carogna, si troveranno numerosi ammassi di uova, agglutinate, biancogiallastre, cilindriche, a estremità arrotondate, più o meno grosse, a seconda della specie a cui appartengono, ma con differenze poco notevoli.

Le condizioni più opportune allo schiudersi delle uova sono date da una superficie piuttosto asciutta, ma in ambiente umido, sempre all'ombra e ad una temperatura piuttosto elevata, 20-25°. In tali condizioni dopo qualche ora dalla deposizione, cominciano a notarsi nelle uova, dapprima lievi movimenti vermicolari, che poi si fanno via via più vivaci, fino a che le giovani larve si allontanano, senza che sul posto ove esse si trovavano rimanga alcun residuo dell'involglio chitinoso di rivestimento.

Migrano così le giovani larve e s'addentrano nelle cavità nasali, nella trachea, nell'esofago, si scavano gallerie sotto la pelle e negli organi, e iniziano così il loro lavorio di demolizione veramente colossale.

Al quarto o al quinto giorno, della carogna del coniglio non rimangono che le nude ossa e la pelle secca, e al posto di essa è tutta una massa brulicante di larve, ricercanti gli ultimi residui di cibo. Sono migliaia e migliaia di larve, che compiuta la loro opera di distruzione e raggiunta la loro fase di sviluppo, cominciano a sciamare in tutte le direzioni, per andarsi a nascondere, sotto i sassi, nelle fessure, ecc. per proteggere il loro bozzolo, nella immobilità dell'ulteriore periodo di sviluppo.

Così, in poche ore, esse scompaiono completamente dal loro campo d'azione, tanto che solo in qualche anfrattuosità ossea si riesce poi a trovare qualche bozzolo. Giunte ai loro nascondigli, si arrestano, si intorpidiscono, si accorciano contraendosi: la superficie del loro corpo diviene asciutta, muta colore, diventando rossastra o bruna, e l'integumento esterno della larva, così modificato, diviene il guscio della ninfa, entro il quale avviene l'ulteriore sviluppo dell'insetto.

Dopo 12-15 giorni, il bozzolo si fora, e dall'apertura di esso esce la nuova mosca, umida, con le ali accasciate e aderenti, le zampe rattrappite, la quale, poco a poco, si asciuga, si sgranchisce e vola via, insetto perfetto, alla sua nuova vita.

Con un po' di esercizio, si riesce a distinguere, se non le uova, certamente le larve e i bozzoli delle varie specie di mosca. Le larve di *L. caesar* e quelle della mosca comune sono, a sviluppo completo, le più piccole, 7-8 millimetri; più grosse e più tozze sono quelle di *C. vomitoria*, che raggiungono il diametro di 2-3 mm. e la lunghezza di 10-12; ancora più grosse sono quelle di *S. carnaria*

che talora raggiungono la lunghezza di 17-18 mm. La difficoltà di distinguerle sta in ciò, che, non avendo tutte le larve che si trovano su un pezzo di carne in putrefazione, la stessa età, per la successiva deposizione delle uova per parte di diverse mosche, si avranno delle larve sviluppate di *L. caesar* grosse come larve giovani di *C. vomitoria*, sicchè solo a sviluppo completo sarà possibile distinguerle. Solo le larve di *S. carnaria* si distinguono bene, avendo l'estremità caudale foggiata a ventosa, disposizione che si ritrova poi anche nel bozzolo.

I bozzoli di mosca comune sono allungati, nerastri; quelli di *L. caesar*, della stessa lunghezza, ma un po' più tozzi, lisci, lucenti, color pulce; quelli di *C. vomitoria* sono più grandi, color caffè tostato, e quelli di *S. carnaria* ancora più grandi, opachi, di color nerastro, e ad una estremità hanno come un rientramento dell'involglio chitinoso, foggiato a cercine.

Assistendo all'opera così rapida e davvero impressionante di demolizione compiuta da queste larve, la quale, dato un numero sufficiente di mosche e la stagione propizia, dev'essere eguale anche nelle carogne di maggior mole, tanto da costituire una spietata concorrenza ai grossi mammiferi e agli uccelli di rapina, si è costretti a pensare alla importante funzione che hanno le larve di questi ditteri, nell'economia generale della natura.

E alla mente dell'igienista si affacciano altre considerazioni non meno importanti, sul destino dei germi patogeni delle carogne di animali morti di malattie infettive, che vanno preda delle larve delle mosche. Se questi germi possono soggiornare nell'intestino delle larve, durante il periodo di ninfa, fino allo sviluppo dell'insetto perfetto, dotati della loro virulenza, essi possono essere emessi con le feci di questo, ed essere diffusi da per tutto.

***

Ecco quindi una serie di problemi interessanti ch'io, continuando la serie delle mie ricerche sul passaggio dei germi a traverso l'intestino dei vari organismi della scala zoologica, mi accinsi a studiare.

Volli perciò vedere come si comportassero alcuni germi patogeni e saprofiti nelle larve delle mosche, occupandomi in modo speciale delle tre specie di mosche carnarie, *L. caesar*, *C. vomitoria*, *S. carnaria*, che depongono le loro uova a preferenza su la carne in putrefazione (1).

(1) Dico *a preferenza* perchè ebbi campo di osservare più volte la deposizione delle uova e lo sviluppo delle larve anche su uova putrefatte.

Non sempre mi fu possibile eseguire sistematicamente le stesse ricerche su le tre specie di larve, e ciò a seconda del metodo seguito nella raccolta del materiale d'esperimento.

Infatti talora si esponeva su una terrazzina dell'Istituto una carogna di cavia o di coniglio, sezionata e in principio di putrefazione, e si catturavano le mosche che accorrevano ad essa, prelevandone le uova con la espressione forzata dell'addome. Questo era il metodo più rigoroso e che permetteva di sapere con quale specie di larve si sperimentava, ma esso era anche il meno comodo e permetteva di raccogliere un materiale meno abbondante, per la difficoltà di cattura delle mosche, e perchè non sempre le uova così ottenute si trovavano in pieno stato di maturità, e quindi molta parte del materiale raccolto non era utilizzabile.

Talora si raccoglievano le uova deposte dalle mosche su la pelle dei conigli o nelle cavità nasali o boccali, si lavavano con acqua sterile e poi si utilizzavano. Ma in questo caso non si poteva sapere esattamente con quale specie di larve si operasse, prima che la fase di sviluppo fosse compiuta.

Qualche volta si potè utilizzare un metodo che permetteva di raccogliere il materiale di studio su una superficie pulita e non inquinata, ma naturalmente in scarsa quantità: si ponevano a quest'uopo dei pezzi di carne in avanzata putrefazione in un bicchiere che si ricopriva con un disco di carta da filtro, sostenuta e protetta da una reticella metallica alquanto sollevata su la carta e si collocava il bicchiere al buio, sotto un vaso da fiori capovolto. La mosca attirata dall'odore della carne in putrefazione, penetrava dal foro di scolo del fondo del vaso, e, pur senza vedere la carne, deponeva le uova su la carta da filtro, insinuando a traverso le maglie della reticella l'estremità appuntita dell'addome, che si svagina come una tromba, per la deposizione delle uova.

Talora, infine, si esponeva la carogna infetta o la carne inquinata artificialmente all'aperto, e si lasciava che le mosche di qualunque specie vi deponessero le uova, e poi si catturavano le larve racchiudendole in gabbiette di rete metallica ove poi si faceva una cernita dei bozzoli.

Del resto, come si vide poi, le varie specie di larve si comportano allo stesso modo, per quanto riguarda il passaggio dei germi a traverso il loro intestino, e quindi scema l'importanza della distinzione delle varie larve.

***

La prima serie di ricerche fu rivolta, come del resto nei lavori precedenti, allo studio della flora batterica dell'intestino delle larve, cresciute liberamente su la carogna di un animale morto spontaneamente.

Si fecero quattro serie di esperienze, su carne di manzo, cruda o cotta, su carne di coniglio e di cavia, su carne di testuggine, sia esposta liberamente all'aria, sia tenuta in un bicchiere chiuso da una fitta rete metallica, in modo da impedire l'introduzione di mosche o di larve, dopo avere posto su essa le uova di una data specie di mosca.

A vari periodi di sviluppo si prelevavano parecchie larve, e fissate con due spilli su un'assicella, si sezionavano longitudinalmente e l'intestino intero si triturava in un tubo di brodo sterile, col quale si facevano le piastre e le inoculazioni sugli animali.

Nei pezzi di carne esposti liberamente all'aria, a putrefare, e più nelle carni degli animali sezionati, qualche tempo dopo la loro morte, si trova una ricchissima flora microbica. Raschiando con la punta di un bistorì in vari punti, le carni e gli organi in putrefazione, e stemperando il prodotto del raschiamento in acqua sterile, facendo poi delle piastre in serie si ha lo sviluppo di numerosissime colonie, con una grande varietà di germi.

Predominano i protei, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. Zenkeri*; sono frequentissimi i bacilli del gruppo del sottile, *B. subtilis*, *B. radiciformis*, e alcune forme di bacillo similcarbonchio; inoltre i bacilli fluorescenti, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. fluorescens non liquefaciens*, *B. proteus fluorescens*, e abbondano pure i cocchi e i bacilli tifosimili e colisimili. Forme meno frequenti e meno abbondanti sono le sarcine, il b. prodigioso, gli oidi, i blastomiceti e le muffe.

Data la voracità delle larve e il loro ricambio attivissimo, legato ad uno sviluppo enorme, dall'uovo alla larva completa, che si compie in pochi giorni, si poteva prevedere *a priori* un completo parallelismo della flora microbica dell'intestino delle larve e dell'ambiente in cui esse vivono. Infatti le numerose piastre, fatte con l'intestino delle larve, asportato *in toto* e triturato in acqua sterile, confermarono completamente le previsioni. Lasciando da parte alcune forme batteriche accidentali, che apparivano ora nelle piastre delle carni, ora in quelle delle feci delle larve, queste ultime diedero sviluppo alla stessa flora microbica, con grande predominio di protei, di bacilli fluorescenti, di cocchi, di tifosimili e colisimili, di bacilli del gruppo del sottile.

Reputo perciò inutile riportare delle tavole di confronto e dilungarmi oltre nell'esame di questi risultati.

Per le inoculazioni agli animali adoperai sempre l'intestino di più larve di ogni campione di carne. Gli animali inoculati morivano, di solito, in 3ª-5ª giornata, con reperto necroscopico di infezioni miste. Dalla milza e dal sangue si isolarono uno stipite di *B. coli* molto virulento, due o tre varietà di b. tifosimile, più o meno virulento, fra cui frequente il b. del pseudoedema maligno, uno stafilococco aureo, un b. similcarbonchio mobilissimo, ma simile per tutti gli altri caratteri al vero bacillo del carbonchio, il quale uccideva le cavie in 24-36 ore, col reperto di una setticemia carbonchiosa, e un *B. proteus fluorescens*, dotato pure di notevole potere patogeno.

Invece le inoculazioni del materiale asportato col raschiamento dalla carne e dagli organi degli animali invasi dalle larve, diede un risultato diverso. Parecchi animali inoculati presentarono una lieva infiltrazione alla sede dell'innesto, ma sopravvissero; altri morirono dopo 7-10 giorni con limitate raccolte purulente, contenenti cocchi e forme di batteri colisimili poco virulenti; pochi animali morirono di pseudo-edema maligno, e solo uno morì di setticemia da *B. proteus fluorescens*.

Il risultato comparativo delle inoculazioni del contenuto intestinale delle larve e del materiale di cui le larve si nutrono, mostra quindi una maggior virulenza dei germi intestinali. Pare che anche in queste larve, come in quelle di maggiolino, l'ambiente intestinale abbia il potere di esaltare, in date condizioni, la virulenza dei germi.

In questo caso non si poteva pensare a istituire delle prove sperimentali

al riguardo, data la molteplicità delle forme microbiche del contenuto intestinale delle larve, l'impossibilità assoluta di impoverire di germi il loro contenuto intestinale col digiuno, a causa della loro vita effimera e del ricambio organico attivissimo. Su questa via l'unico modo di ottenere qualche risultato attendibile sarebbe stato quello di introdurre le uova nei tubi di coltura dei microrganismi che si volevano prendere in esame; ma per quante volte abbia fatto questo tentativo, in tubi di coltura di vari microrganismi, sia deponendo le uova su le pareti del tubo che su la patina d'agar, non riuscii a vedere mai svilupparsi le larve, nè da uova raccolte ov'erano state deposte, nè da uova ottenute direttamente dalle mosche. Pare quindi che le uova non si schiudano che quando si trovano in condizioni tali che le larve, appena nate, possano trovare subito a loro portata un alimento confaciente.

Abbandonata a sè, una carogna soggiace ai processi di putrefazione in un tempo più o meno lungo, a seconda delle circostanze: stato di salute pregresso dell'animale, temperatura dell'ambiente, protezione della pelle, ecc. Avanzato che sia il processo di putrefazione, abbiamo visto come nelle carni e negli organi vegetino rigogliosamente molte specie di microrganismi. Molti di essi vi sono caduti dall'aria, altri, migrando a traverso le pareti intestinali, si diffondono nei tessuti circostanti, altri, se l'animale è morto d'una infezione setticoemica, si trovano in tutti gli organi e vi si sviluppano. Ma a me interessava determinare se anche le uova depositate dalle mosche portassero sul cadavere il loro contributo di germi.

Un primo esame delle uova delle tre specie di mosche carnarie e di quella delle mosche comuni, raccolte con l'espressione forzata dell'addome dell'insetto e triturate in brodo sterile o direttamente nell'agar fuso e pronto a solidificarsi, diede luogo a un abbondante sviluppo di germi. Si provò ripetutamente ad agitare le uova così raccolte in acqua sterile rinnovata più volte, ma anche così dalle piastre si ebbe un notevole sviluppo di germi. Ritenendo insufficiente questo metodo per allontanare tutti i germi aderenti alla superficie delle uova e forse trattenuti in gran parte da quella sostanza mucilaginosa che le mantiene agglutinate, provai ad agitarle per 1-2 minuti in soluzioni di sublimato all'1 ‰ o in soluzione fenica al 4 %, allontanando poi il disinfettante con acqua sterile. Ma anche le colture allestite col materiale così trattato diedero sviluppo a molte colonie; probabilmente neanche a questo modo si riusciva ad allontanare completamente la sostanza agglutinante che funziona come strato protettivo dei germi. Impiegando le stesse soluzioni a caldo (40-45°), o per un tempo più lungo (5-10 minuti), o in maggiore concentrazione, e preparando poi le colture allo stesso modo, previa lavatura con acqua sterile, si ottennero finalmente delle piastre sterili o poverissime di germi. Ma in questo modo, per quanto sappiamo che la chitina è resistentissima e non si lascia attraversare neanche dagli acidi, non potevamo tuttavia essere sicuri che la disinfezione si fosse arrestata alla superficie esterna delle uova e non avesse agito anche sul contenuto di esse.

Un ultimo mezzo permise di risolvere la questione: lavate le uova ripetute volte in acqua sterile e disgregatele, si trasportarono in un tubo di agar puro e prossimo a solidificarsi, e agitando il tubo si fece una piastra, che si pose nel termostato. Dopo 24 ore la maggior parte delle uova erano circondate da colonie batteriche; solo pochissime uova avevano lasciato l'agar sterile dintorno ad esse. Si prelevavano allora queste uova con l'ansa di platino, si trasportavano rapidamente in tubi di brodo, ove si schiacciavano per provocare la fuoruscita del contenuto. Così si fecero piastre in gran numero, con uova delle varie specie di mosche, e si vide che la massima parte delle provette tenute in stufa, non diedero sviluppo a germi; solo in alcuna si ebbe un inquinamento, probabilmente accidentale e per solito dovuto a muffe, che non avevano avuto agio di svilupparsi nelle piastre.

La quistione del resto, per i fini delle mie ricerche, aveva una importanza secondaria, perchè se le uova deposte su le carni vi portavano dei germi, poco importava che essi fossero contenuti nel tuorlo o piuttosto che fossero aderenti all'invoglio esterno.

In ogni modo rimaneva dimostrato che *su le carni in putrefazione provengono dei germi, oltre che dall'aria, dal contenuto intestinale dell'animale, dal sangue, in caso di setticemia pregressa, anche dalle uova infette depostevi dalle mosche.*

Per sapere quali sorta di germi fossero trasportati dalle uova delle mosche eseguii numerose ricerche.

Dapprima per molti giorni catturai tutte le mosche che capitavano nella sala dell'Istituto, abbastanza frequenti, data la stagione inoltrata; prelevava le uova direttamente e allestiva le piastre. I germi che si trovarono con maggior frequenza furono i protei, alcune specie di similtifo, qualche stipite di *B. coli*, lo stafilococco aureo e l'albo, bacilli fluorescenti, bacilli similcarbonchio e fórme affini.

Di germi patogeni non riscontrai che uno stipite di *B. coli* e due tifosimili.

Nelle piastre fatte con le uova di parecchie mosche catturate in due giorni consecutivi, trovai un gran numero di colonie affatto simili a quelle del bacillo del carbonchio; pensando che si trattasse di uno dei soliti similcarbonchio, isolai delle colture da ogni piastra per saggiarne il potere patogeno. Orbene tutti gli animali inoculati morirono dopo 60-72 ore, col reperto tipico di una setticemia carbonchiosa. Infatti lo studio ulteriore dei caratteri biologici e culturali di questi bacilli mi persuase trattarsi di veri bacilli del carbonchio, provenienti da mosche, che molto probabilmente avevano pasciuto nei dintorni su qualche animale morto di carbonchio. Tant'è che per quante ricerche abbia fatto più tardi, catturando tutte le mosche che poteva, non mi riuscì più di isolare dalle piastre delle uova altri bacilli del carbonchio, ma solo in qualche caso bacilli similcarbonchio non patogeni e mobili.

Volendo determinare sperimentalmente se i germi patogeni, assunti dalle mosche col cibo, passassero invariati a traverso il loro intestino, catturava

delle mosche, faceva l'esame batteriologico delle loro feci, provocandone l'emissione con una moderata pressione sull'addome, e poi le riponevo in un bicchiere coperto da reticella metallica; più tardi, dopo lo sviluppo della piastra, poneva nei bicchieri dei pezzi di carne o di organi di animali morti di carbonchio, di carne di animali sani inquinata con patina colturale sporificata di bacilli del carbonchio, in cui aveva ucciso i bacilli col calore, o di carne di coniglio morto di setticemia da b. prodigioso. Dopo 24 ore l'esame microscopico delle feci delle mosche che avevano pasciuto su carne carbonchiosa mostrava numerosi bacilli del carbonchio, e tanto le piastre eseguite con le feci, che quelle allestite con le uova di cui si provocava l'emissione, davano sviluppo a numerose colonie di carbonchio. La virulenza di questi germi non apparve mutata. Eguale risultato ebbi pure con le stesse mosche dopo 48 ore e con le mosche nutrite di spore carbonchiose o di carne inquinata con b. prodigioso.

Rimaneva quindi confermato dallo esperimento il passaggio dei germi vivi e virulenti, dalla carne infetta alle mosche, da queste, oltre che alle feci, anche alle uova, dal guscio di queste alla carne su cui esse erano deposte.

Cercai perciò di indagare se poteva seguire gli ulteriori anelli della catena. A quest'uopo prelevai con le maggiori cautele di asepsi il cuore, la milza e il fegato di un coniglio morto di carbonchio e lo deposi in una scatola di Petri sterile, immettendo poi in essa delle uova di mosche, ottenute artificialmente e lavate con acqua sterile. Le larve svilupparono benissimo e in pochi giorni distrussero completamante gli organi ch'erano nella scatola di Petri. Giornalmente intanto io aveva prelevato due o tre larve, lavate e sezionate, trasportando poi l'intestino *in toto* in un tubo di agar fuso, triturandovelo e facendo piastre. In tutte le piastre si svilupparono delle colonie di carbonchio, che isolava per il controllo della virulenza.

Dei pezzi di carne vaccina furono inquinati abbondantemente, alcuni con bacillo rosso di Kiel, altri con una sarcina auranziaca, altri con un oidio, altri con spore di carbonchio, e si misero su di essi le uova di mosche, prelevate in vario modo.

D'altra parte si abbandonarono a sè le carogne di due conigli morti uno per setticemia da B. prodigioso, l'altro per setticemia da un *B. fluorescens liquefaciens* patogeno, e si trovarono in breve invase da numerosissime larve.

Dall'esame delle piastre fatte col contenuto intestinale di tutte queste larve, prelevate nei vari giorni, si potè constatare costantemente il passaggio nelle feci dei germi che si trovavano nelle carni su cui le larve erano cresciute. I batteri patogeni conservarono immutata la loro virulenza.

Stabilita così l'esistenza di un altro anello della catena, si poteva dire di aver seguito i germi a traverso le loro varie tappe: carne infetta, mosca adulta, [feci e] uova, carni non infette, larve. Rimaneva a stabilire l'esistenza dell'ultimo anello, per poter seguire di continuo

i germi dalla mosca madre alla mosca figlia e da questa all'ambiente.

Raccolsi a quest'uopo un gran numero di larve che si erano nutrite di carne di animale carbonchioso, di carne di coniglio morto di setticemia da B. prodigioso o da *B. fluorescens liquefaciens*, di carne inquinata artificialmente con patina culturale di B. rosso di Kiel, di sarcina auranziaca, di stafilococco piogeno citreo, di un oidio. Le larve erano già mature e furono rinchiuse in altrettante gabbiette di rete metallica, ove, dopo aver cercato invano di fuggire (talune rimanevano impigliate nella rete e non potevano più liberarsi) subirono l'ulteriore fase di sviluppo. Dopo 12-15 giorni i bozzoli cominciarono a schiudersi. Allora ogni giorno catturavo le mosche appena uscite dal guscio chitinoso, raccoglievo una gocciolina di feci che la semplice cattura faceva apparire all'orifizio anale, poi le sezionavo e trituravo l'intestino *in toto* in un tubo di agar fuso, che utilizzavo per le piastre.

Potei così constatare che tutte le mosche contenevano ancora nell'intestino, vivi e virulenti, i germi che avevano assunto col cibo durante il periodo larvale.

Poichè al 15° giorno tutti i bozzoli erano schiusi, cercai di conservare più a lungo che mi fu possibile le mosche, per vedere per quanti giorni ancora si potessero dimostrare nel loro contenuto intestinale i germi introdotti nel periodo larvale. Ma per quanto introducessi del cibo nella gabbietta, non potei conservare in vita le mosche che sino al 9° giorno. Forse con una diversa preparazione o con gabbie molto più ampie, che avessero permesso alle mosche di volare, si avrebbe potuto seguirle molto più a lungo, ma ciò non potei fare allora. Ma fino al 9° giorno potei constatare la presenza nel loro intestino dei germi introdotti col cibo, durante il periodo larvale.

Ero intanto riuscito a dimostrare la continuità di trasmissione dei germi patogeni dall'ambiente inquinato alla mosca adulta, da questa alle feci e all'invoglio esterno delle uova, dalle uova al cibo delle larve e da questo all'intestino delle larve e delle mosche complete, dalle quali poi gli stessi germi erano ridonati, con le feci, all'ambiente.

Questo ciclo di trasmissione rende verosimile l'ipotesi che per questa via si ottenga la trasmissione e la riproduzione di alcune malattie infettive del bestiame, che compaiono talora sporadicamente, talora endemicamente, senza che se ne possa dimostrare l'origine, e di cui gli agenti patogeni non furono mai ritrovati, nè nel suolo, nè nell'ambiente che circonda gli animali colpiti dall'infezione: tali il carbonchio ematico e il carbonchio sintomatico.

Tale ipotesi mi parve per un momento acquistasse forma di realtà, dopo il reperto di bacilli del carbonchio in molte mosche catturate nell'istituto, come riferii più sopra, senza peraltro che nell'istituto, nei giorni precedenti, fosse stato sezionato alcun animale morto di carbonchio.

Ma il reperto non si ripetè altre volte e per quante mosche abbia poi catturato, l'anno scorso e in questa primavera, non mi fu mai possibile isolare, nè dalle loro feci, nè dalle uova alcuno stipite di vero bacillo del carbonchio.

Del resto non sarebbe troppo ardito supporre, che come la zanzara costituisce l'oste intermedio e necessario del parassita della malaria, senza che per ciò tutte le zanzare sieno infette, così avvenga anche per le mosche, o almeno per qualche specie di esse (le mosche da cui isolai i bacilli del carbonchio appartenevano tutte alla specie *C. vomitoria*), le quali potrebbero costituire l'oste intermedio del carbonchio sintomatico, senza che tutti gli insetti ne fossero infetti.

In ogni modo, il problema è di tale importanza che merita di essere studiato a sè, e non sarà quindi inutile avere accennato anche a questa ipotesi, che dovrebbe essere suffragata da numerose esperienze.

Dalle esperienze su riferite parmi quindi potere trarre le seguenti conclusioni:

a) La flora microbica dell'intestino delle larve delle varie specie di mosche carnarie è press'a poco eguale a quella delle carni in putrefazione su cui esse vivono.

b) Essa è composta in gran parte di protei, di bacilli fluorescenti, di bacilli del gruppo del sottile, di cocchi, di bacilli tifosimili e colisimili.

c) Tale flora è eguale nelle varie specie di carne, tanto degli animali a sangue caldo che di quelli a sangue freddo, e nelle varie specie di mosche.

d) La flora microbica dell'intestino delle larve pare dotata di maggior virulenza della flora microbica delle carni in putrefazione su cui esse si sono sviluppate.

e) I germi delle carni in putrefazione provengono, oltre che dall'aria, dal contenuto intestinale e dal sangue degli animali morti di setticemie, anche dalle mosche, che ve li depongono sia con le zampe che con le uova.

f) Il contenuto delle uova delle mosche è sterile, ma il loro invoglio esterno contiene numerosi germi.

g) I germi introdotti col cibo dalle mosche, passano vivi e virulenti, sia nelle loro feci che su la superficie delle uova.

h) Nel contenuto intestinale delle larve passano i germi patogeni contenuti nelle carni di cui esse si sono nutrite.

i) Questi germi patogeni soggiornano vivi e virulenti nel loro canale alimentare, durante il periodo di ninfa, e si ritrovano poi nell'intestino della mosca, che li può disseminare con le feci.

k) Si può ricostruire il ciclo di trasmissione dei germi patogeni dall'ambiente alla mosca madre, e da questa alla mosca figlia, per il tramite delle larve e delle ninfe delle carni in putrefazione.

Messina, luglio 1906.

ST

